

# ファネル談義<sup>1</sup>

— なぜ蛋白質は一義的に効率よく折り畳むのでしょうか？ —

名古屋大学 人間情報学研究科 笹井理生<sup>2</sup>

神戸大学 理学部 小松崎 民樹<sup>3</sup>

奈良女子大学 理学部 戸田幹人<sup>4</sup>

笹井：メールありがとうございました。でも、たぶん私の意見と戸田さん・小松崎さんの意見は少し違っているの、返事を書いてみます。

折れ畳みのダイナミクスは、漏斗型エネルギー地形上をランダムに滑り落ちていくような（単純な）描像では解釈しきれない部分が多いことが、最近指摘されている。

とありますが、具体的にどのようなデータの何を想定されているのでしょうか？初期状態によって、エネルギー地形のどこをおちていくかが異なる、という実験データはあります [2]。また、漏斗型エネルギー地形の中にも構造があって、経路が統計的に集中しやすいところとそうでないところがある、という指摘はたくさんあります [3, 4, 5]。その発想で実験データを定量的に解釈する試みも盛んに行われています。でも、そういった議論は、大域的にみて漏斗型になっているエネルギー地形をランダムに（ランダムという意味は等確率で無相関に、という意味ではなくて、確率的に、と言う意味で）滑り落ちる、という前提を揺るがすものありません。漏斗型エネルギー地形をランダムに滑り落ちる、とは単純なダイナミクスか、というところとは限らない、というわけです。同様に、

複数のサドルを越えていく過程の間に、確率論的な独立事象としては捉えきれない「動的な相関」が存在し、それが、「折れ畳みの効率の良さ・頑健さ」と深く関連しているのではないか、という仮説が考えられる。

においても、独立ではない、という意見には賛成です。たぶん、おれたたみの1分子計測のデータが蓄積されれば、相関のあるデータがいっぱいできると予想します。ひもの形や配列に情報がコードされている以上、エネルギー面がどこでも同じというわけではなく、形状やでこぼこ具合に特徴があるので、それだけからも当然、独立でない確率事象として折れたたみは進むと思われれます。つまり、独立な確率事象ではない、というだけで、力学系の動的相関が必要という仮説を考える根拠にはならないのでは？あるいは、もうちょっと別のタイプのデータのことをおっしゃっているのでしょうか？

更には、

<sup>1</sup> 本稿は平成13年11月19～21日に戸田と小松崎が主催した研究会「複雑な多谷ポテンシャルエネルギー面上で生起する動力学的問題」(奈良女子大)において、招待講演者のひとりであり、主催者の2人と旧知である笹井が趣意書 [?] の一部に質問を投げ掛け、3人で、その後、メールを介して議論しあったものを一部、加筆修正してまとめたものである。

<sup>2</sup> E-mail: sasai@info.human.nagoya-u.ac.jp

<sup>3</sup> E-mail: tamiki@kobe-u.ac.jp

<sup>4</sup> E-mail: toda@ki-rin.phys.nara-wu.ac.jp

残基の総数が増大すればするほど、考え得る状態空間は急激に増大するため、単純なファネル型描像（ファネル型ポテンシャル地形上の乱歩問題）では捉えきれない、（限定された）ダイナミカルな経路が、生体高分子としての折れ畳みの機能（すなわち、効率性・頑健性）に重要な役割を果たしているという可能性が考えられる

とありますが、状態空間が大きくなるとファネル型描像では実験が説明できない、というのは、どのような見積もりをされたのでしょうか？論理的に大丈夫？実際の蛋白質はサイズが大きくなるとドメイン構造を持っていて、それがエネルギー面の設計と関係あるかどうかは面白いところですが、ひものからまりやすさ、というようなトポロジーの問題と関わっているような気はします。

サドルを越えるときには、局所平衡がなりたたなくて、その結果、トラジェクトリーに動的に相関が現れる、という可能性は大いにあり得ると思います。でも、サドルを越えるのは  $10^{-12}$  から  $10^{-10}$  秒に 1 回ほどなので、たとえばヘリックスやその他の部分構造ができるために特徴的な、 $10^{-6}$  秒のスケールまで相関が生き残っているかどうか？というのは興味深い問題だと思います。さらに、蛋白質全体がおれたたむのは  $10^{-3}$  秒から  $10^1$  秒のオーダーなのでここまで相関が残っている、というのはすごい主張ですが、そういうことが絶対ない、とはいえません。とにかく、調べてみることに価値がある、というところまでは賛成です。

主催者と講演者の意見が一致しなくていいし、しないほうが面白いので楽しみは当日までとっておくことにしたほうがいい？

小松崎：メールを介した議論というのは、時にとても有用な展開を見せることを経験していますので、なにも（おいしいものを）当日までとっておく必要はないように思います。時間のあるときに、返事のメールを書けば、時間もさほど取られないのでは？

僕らが考えている動的相関の存在を直接支持する実験データは現在はありません [1] が、動的相関の存在を示唆する理論研究はいくつかあります。例えば、Los Alamos Lab. の生物物理の A.E. Garcia らの論文 [?, 7] など。また、動的相関（非マルコフ性）の議論は Plotkin-Wolynes の論文 [8] にもあります。一昨年、夏にボストンで Wolynes と直接あった際に議論したのですが、Wolynes 自身は「動的相関がないと言い切れないが、殆んどの場合は、純粋な拡散過程として見做すことができる」ため、この方向の研究は pending していると話していましたが、ただ、完全に否定することはできず、研究する価値は高いから “Do it!” と評していました。

運動の描像は、観測する視点、すなわち、反応座標になにをとるかによって、大きく変わります。Garcia の研究の概要は、簡単に述べると、チトクローム c の水溶液中における折れ畳み（全原子）シミュレーションを各温度領域で行い、主成分解析（蛋白質部分の）を各温度で行って、（最小二乗的な意味で）揺らぎの分散を最も良く表す第一、第二主成分の 2 乗の期待値を時間に対して各温度でプロットしました。その結果、あるベイスン内のこれらの主成分方向の運動は、subdiffusion 的（時間の巾数が 1 以下、彼らの算出は 0.5）でベイスンを越える主成分方向の運動は superdiffusion 的（時間の巾数が 1 以上、1.75）であり、相空間が一様に真っ黒けと想像する転移温度領域においても、superdiffusion 的な主成分運動が観測され、より高温になると、通常拡散の 1 に近づくことが見いだされました。ちなみに、我々の 46beads model に基づく埋め込み次元解析 [9] でも同様の傾向が認められます。

実験データのなかに動的な相関の証拠を見いだすのは現時点では難しいと思います。1分子測定技術が進歩して、1分子のおれ畳みの、しかも、特定の自由度に顕在化した物理量の時間変化を追うことができれば、動的相関の議論が出来るはずです。

状態空間が大きくなるとファネル型描像では実験が説明できない、というのは、どのような見積もりをされたのでしょうか？論理的に大丈夫？

に対する箇所の我々の記述は「ファネル型描像では実験が説明できない」と断定的に言っているつもりはありません。状態空間が大きくなればなるほど、(エネルギー的バイアスが天然構造へ掛っているとされるファネル型エネルギー地形が非ファネル型になる傾向が強くなるという予想以外に)、なんらかの動的相関を伴うダイナミクスが折れ畳みの効率が良いことと関連してくるのではなからうかという問題提起で、数字的な見積もりはまだです。

サドルを越えるのは  $10^{-12}$  から  $10^{-10}$  秒に1回ほどなので、たとえばヘリックスやその他の部分構造ができるために特徴的な、 $10^{-6}$  秒のスケールまで相関が生き残っているかどうか？というのは興味深い問題だと思います。

の部分に関しては、観測する視点、反応座標の選択が最も重要となります。native contact 数などの指標では捉えることは絶対できないと思います。Garcia らの主成分座標はひとつの候補です。単純な原子座標の線形結合で、異常拡散を捉えることができたのは勇気づけられますが、他にも色々な候補が考えられます。一般的に、分子運動に特徴的な時定数よりも遥かに長時間(実は中程度に長時間)の動的相関を議論するのは、一見すると否定される傾向がありますが、必ずしも僕らはそうは捉えていません。例えば、現フリッツハーバー研究所(ドイツ)の柴田 達夫さんと東大の金子邦彦さんの集団的カオス [14, 15, 16] やイタリアの Vulpiani ら [11, 12, 13] の有限サイズリヤブノフ概念のように、ミクロには強いカオスでミクロな相関は短時間に消失するが、マクロには弱いカオスでマクロレベルでは相関が長時間残るようなダイナミクスは充分存在し得ます。 $10^{-3}$  秒から  $10^1$  秒の時間になると、動的相関を残すとしても、 $10^{-6}$  秒のスケールにおける動的相関を有する自由度が組み替わるなどの、別のメカニズムを想定する必要がありますが、仮にその時間領域まで残らなくても折れ畳みの効率は  $10^{-6}$  秒のスケールに渡る動的相関があるだけで良くなると想像します。

戸田：蛋白の折り畳みに関しては、笹井さんと議論をしたいと思っていましたので問題提起は大歓迎です。ここでは、別の観点から書いてみます。

問題は、「ミクロな情報処理系は、どのような非平衡状態にあるときに、機能し得るのか」ということです。「Maxwell の悪魔のパラドックス」として知られているように、熱平衡の下では、情報処理系は機能し得ません。(これに関して、Landauer[?] や Bennet[?] の立場を含めて、いろんな論点があります [?] が、とりあえずはおいておきます)

従って、情報処理系において、非平衡状態の存在は不可欠ですが、マクロな場合と分子レベルでは、問題の設定が異なります。マクロな系では局所平衡を前提とできるので、マクロには小さいが、ミクロには十分大きい領域において温度などの熱力学的な量が定義できます。従って非平衡とは、各領域における温度が異なることを意味し、情報処理系も、このような意味における非平衡状態にあります。この時、熱力学的

な仕事の効率と、情報処理の効率を同一視できるとすると、情報処理系の効率の上限は、カルノーサイクルの効率で与えられることになります。

このような問題設定を、分子レベルにそのまま持ち込めるのか、という問題が、ここでの焦点です。その中心をなす疑問が、局所平衡の成立の可否です。さらに、実際的な状況を考えると、生体反応の場合、300ケルビンの平均温度の下で、数度程度の温度勾配が仮にあったとしても、カルノーサイクルの熱効率は、ごく限られたものにしかありません。実際の熱機関の効率が、カルノーサイクルの効率をはるかに下回ることを考えると、局所平衡を仮定した議論では、生体反応の効率性を説明できないのではないか、という疑問が起ります。

以上のような疑問から、「局所平衡の破綻」が「機能の発現」に不可欠なのではないか、と考えた次第です。小松崎君も書いているように、今のところ、この方向を指示する実験事実は無いです。しかし僕の立場は、極論すれば、現時点での実験事実の範囲内に、想像力をとどめておく必要はない、というものです。理論的な可能性を突き詰めることが、理論家の使命ではないのか、と考えています。この文章を、純然たる理論的可能性の議論に限っているのも、現時点での実験結果に左右されずに、純理論的に考えたらどうなるのか、を示したいからです。

尚、上記の論点と密接に関連するのが、「詳細釣り合い」の成立です。「詳細釣り合い」が成立していると、仮にバイアスが加わった状況であっても、平均としては「仕事」を取り出すことはできません。従って、「仕事」を取り出すためには、「詳細釣り合い」が破綻していなければなりません。現時点で、「詳細釣り合い」が破綻している状況を扱うためには、線形非平衡の下で摂動として扱うか（この場合も、温度勾配を扱うのは困難）、あるいは、局所平衡を部分的に仮定して、そのあいだを力学系でつなく「非平衡定常論」のどちらかを使う他ありません。しかし、いずれにせよ分子レベルの問題に対しては、上に指摘した問題のため不満足です。

このような純然たる理論的な要請に基いて、局所平衡を前提としない、力学系による研究が必要なのではないか、と考えています。笹井さんからの、反論を期待しています。

笹井:では、お誘いに応じまして；

従って、情報処理系において、非平衡状態の存在は不可欠ですが、マクロな場合と分子レベルでは、問題の設定が異なります。マクロな系では局所平衡を前提とできるので、マクロには小さいが、ミクロには十分大きい領域において温度などの熱力学的な量が定義できます。

までは賛成ですが、

従って非平衡とは、各領域における温度が異なることを意味し、情報処理系も、このような意味における非平衡状態にあります

はそうではない、と思います。温度の定義にもよりますが、分子の振動エネルギー、回転エネルギーといった、 $10^{-15}$  秒から  $10^{-12}$  秒の周期の運動によって温度を定義すれば、folding が問題になる  $10^{-6}$  秒以上では、対象としている分子を含んだかなり広い領域で温度は一定になり、局所平衡がなりたっていると考えたほうが自然です。実際、分光学的に蛋白質の「温度」の緩和を測ると  $10^{-11}$  秒の程度です。<sup>5</sup>

<sup>5</sup> その後、赤外振動モードが 500ps で緩和するという例が報告された [10]。

folding という一種の情報処理（ユニークな構造をランダムな構造から選び出す）は、 $10^{-3}$  秒から  $10^1$  秒程度で起こる過程ですが、これは上記のように運動がミックスされている条件下で、多数の構造間を遷移しながら起こる過程なのでこんなに遅いわけですが、それでもなお、エネルギー面が広い範囲にわたって大域的なバイアス（ファネル）を持っているために、高い効率で確実な変化が起こります。こんなに広い範囲にわたってバイアスを持つように設計できる、ということ自体が興味深いことです。

folding で生じる変化は、効率は高いけれど、ランダムな拡散過程であり、統計的に扱わなければならない、というのがこの 10 年間のフォールディング研究の結論でした。この説明で想定している論理は、「強磁性イジング系の緩和が温度が完全に定義されたモンテカルロで計算できる」というのとほぼ同じです。イジングスピンは可能なスピン配置を全部とりながら緩和するのではない、という意味で Levinthal パラドックスを回避していますし、Hopfield 模型は情報処理をすることができます。

しかし、そこまで単純ではなくて、さらに、小松崎さんが指摘したように、ランダムだけれどその中に動的相関がある、そういうタイプの運動である可能性は高く、蛋白質の機能に動的相関が関与している可能性はおもしろい可能性です。Plotkin-Wolynes はそういう状況を記述しようとして overdamped の一般化ランジェバン方程式を基礎にして、まさつの周波数依存性やポテンシャルの非線形性がもとで動的相関が起こることを指摘しています。

つまり、圧倒的多数の自由度は局所平衡になっているが、少数の（といってもまだ大自由度の）運動が非平衡として残っていて、それは広い複雑なエネルギー面上のゆっくりした overdamped の拡散として記述できる、というわけです。生体高分子が情報素子として動作している場合、その時間スケールが  $10^{-3}$  秒から  $10^1$  秒程度であれば（それは多数の蛋白質の動作の時間スケールなのですが）folding と同じ機構が働いているに違いない、というのは我々の主張 [17] です。

「詳細釣り合い」が成立していると、仮にバイアスが加わった状況であっても、平均としては「仕事」を取り出すことはできません。従って、「仕事」を取り出すためには、「詳細釣り合い」が破綻していなければなりません。現時点で、「詳細釣り合い」が破綻している状況を扱うためには、線形非平衡の下で摂動として扱うか（この場合も、温度勾配を扱うのは困難）、あるいは、局所平衡を部分的に仮定して、そのあいだを力学系でつなぐ「非平衡定常論」のどちらかを使う他ありません。

の箇所は「詳細釣り合い」の定義次第で話がすれ違ってしまっていますが、すれ違いを避けるために、「揺動散逸定理が成り立っている」というなら、folding はそうした揺動散逸定理が成り立っている過程だと思われれます（一般化ランジェバン方程式で温度が定義できる）。そういう意味で、局所平衡の熱浴にさらされた非平衡状態からの緩和運動とみなせると思うのです。もちろん、これは  $10^{-3}$  秒、といった長いスケールでみたときの話で、 $10^{-9}$  秒程度のスケールではそれがなりたっていない、overdamped でもないし揺動散逸定理もなりたっていない、という可能性があります。Garcia の見つけた  $10^{-9}$  秒程度のスケールで見える異常拡散がそうした機構で説明できるかどうか、は興味深いところです。

Vale-大沢 [18] の説明のように、ミリ秒以上も温度の不均一性が分子内で残っている、というのはありえない話です。すべてのエネルギーの不均一性を温度の不均一性と表現する、と定義すれば、もちろん話は別ですが、ランジェバン方程式で、あるいはマスター方程式の遷移確率で定義されるのが温度である、という範囲では、温度は  $10^{-9}$  秒程度で生体分子を含む広い範囲で一定になる、と解釈するべきだと思います。<sup>6</sup>

<sup>6</sup> 蛋白質 1 分子が問題になる  $10^{-8}$ m 程度の範囲では、 $10^{-9}$  秒程度ですでに温度は一定になっていると思われるが、例えばアク

私の感じていることをまとめますと

- (1) エネルギー面のサドルを越える運動が起こる  $10^{-10}$  秒から  $10^{-9}$  秒のできごとにおいて、力学系のカオスの構造が運動に直接現れる可能性は大いにあるけれどそれは自明ではなくて、本当にそうかどうか確かめる必要があること、もし、カオスのコヒーレンスが現れていたら、それが構造ゆらぎを通じて蛋白質の機能や folding の素過程としてどのような意味を持つか、を考えることは大切だと思う。
- (2) 複数のサドルを越える過程を繰り返しても、なおカオスのコヒーレンスが残るかどうかは、もし、サドルを越えるたびに主要なモードの方向が大きく切り替わるのなら、ランダムイズされてコヒーレンスは失われ、Langevin 方程式で記述することが適切になる。もし、サドルを複数回乗り越えるのに相関が残っていると、コヒーレンスも残るかもしれない。どこまで残るか、というのは興味深い問題と思います。
- (3) folding のレベルまでは 100 万回<sup>7</sup> ほど多様なサドルの乗り越えを繰り返して到達するので、そこまでカオスの構造が効いている、というのは考えにくいことのように思うけれど、証明されていないことなので確かめることに意義があるとは思う。仮想的だが、underdamped で Go 相互作用 [19] をする鎖の運動にはカオスの構造が残っているかもしれない。それが現実的になるとどう消えていくか、という情報から何か発見があるかもしれない。質量/まさつを 0 に、かつ、フラストレーションを有限にする極限操作の中で、なにがどういうスピードで変化するかわかればよい。

だけど、

- (4)
- a) folding 過程には動的相関があり得る。
  - b) 情報処理機能の実現するためには非平衡過程でないといけない
  - c) 鎖の長さが長くなるとファネル描像はなりたたなくなる
- という指摘から力学系のカオスを考えることが必要である、というふうにはならなくて、a), b) はカオスによらない他の説明が可能だし、c) はよく意味がわからなかった、

という具合です。

笹井:まだ前のメールで伝わっていないところがあったかもしれないのでうちよつと補足させてください。

folding の問題で、Plotkin-Wolynes が overdamped の時間おくれのまさつのある Langevin 方程式を使ったのは、共感を感じます。overdamped というわけは、蛋白質は、まわりの溶媒も含めると  $10^4$  から  $10^5$  の自由度を持つ系ですが、その 99% 以上は  $10^{-9}$  秒以下で damp すると思われる、というのはのその特徴的な運動の早さが  $10^{-12}$  秒以下だからですが。のこり自由度のうち、 $10^2$  程度の自由度が  $10^{-6}$  から  $10^1$  秒の

---

チンフィラメント全体の長さである  $10^{-5}$  m に及ぶ範囲では、 $10^{-3}$  秒程度の寿命の温度の不均一さがあってもよい。また、膜などで仕切られて分子の拡散が制限されている場合、 $10^{-9}$  m のスケールでも化学ポテンシャルの不均一さが  $10^{-3}$  秒以上残ることはあり得る。

<sup>7</sup> 高速の folding でも  $10^{-3}$  秒程度のできごとであるのに比べ、鎖の構造変化は  $10^{-9}$  秒に 1 回ほど起こる。従って、鎖の構造変化がエネルギー面のサドルの乗り越えだとすれば、folding には 100 万回ほどのサドルの乗り越えが必要と思われる。溶媒分子や側鎖の回転など小規模な構造変化に対応するサドルの乗り越えは、もっと頻繁に起きている。

レンジで運動する folding に関するモードというふうなので、これらの自由度の記述は overdamped の、時間おくれのまさつのない、Langevin 方程式として近似できる。もちろん、これは近似なのでどこまで成り立って、どこから成り立っていないかは問題です。

さらに、folding のオーダーパラメータとして 1 ~ 2 自由度を選べば、このダイナミクスは、ある構造をとったら次はこの構造にしか移れない、という幾何学的制限や相互作用からくる制限をすべて捨象した記述なので、捨てた部分は時間相関のあるまさつ、として一部とりこむことができる（完全ではないが）というわけです。folding のオーダーパラメータとして単純にネイティブ結合数をとるのはよくない、という小松崎さんの指摘には賛成で、捨てた自由度の効果が最小になるモードを選ぶ、という目的のために underdamped の鎖の運動を手がかりにする、というのはよい方法だと思います。実際の overdamped の蛋白質から離れて、おれたたむひもの物理、というより広い世界を想定してその中で、underdamped の鎖でよくわかる概念が overdamped の鎖にあてはまるかどうか比較する、ということは物理のスタイルとして正しい方向だと思うからです。さらに極論すれば、おれたたむひもの物理の世界で深い概念があれば、現実の蛋白質を離れてなりたっているにもかかわらず（ニューラルネットの物理が実際の生物のニューラルネットとは離れて研究されているように）、ただ、実際の蛋白質における局所平衡、詳細つりあい、機能、などの問題を考える際には、時間スケールや自由度のスケールの考察が必要だと思います。ラチェットモデルやその改良の議論には、そういう視点が抜けているので、それを蛋白質に適用しようとするのは、あやうい議論のように思います。

戸田:熱力学の第 2 法則によれば、温度差あるいは化学ポテンシャルの差が存在して初めて、サイクルを用いて熱力学的な仕事を取り出せます。熱力学的な仕事と情報処理を等価な過程と考えると、このことから、蛋白質を取り巻く環境が本当に温度一定ならば、高分子は、サイクルを構成する熱機関としては、何の機能も果たせないことになります。

従って、環境が常に温度一定の熱浴であるとする立場で情報処理を考えようとする、情報処理に關与する自由度の初期条件を、周囲の環境と平衡にない分布におく必要があります。さらに、熱機関のようにサイクルを組むのではなく、システムの「使い捨て」が必要です。

蛋白質の折れ畳みの場合、一個の分子に着目して、その分子をポテンシャルの高い場所におけば、その分子のその後の動きは、平均としてポテンシャルの坂を下がっていくものになるでしょう。これが、笹井さんの言われる情報処理の例です。しかし、一個の分子ではなく分子のアンサンブルを考え、そのアンサンブルの平均としての動きを考えた時には、既に折り畳んだ蛋白質がほどける可能性を考慮して、アンサンブル全体としての動きを考える必要があります。この時、「詳細釣り合い」を満たしたアンサンブルを考えると、運動は相殺され平均としてはゼロになるというのが前回の僕の議論でした。

これに対して、僕の意味で「詳細釣り合い」を破った初期分布を考えると情報処理ができますが、問題は、この情報処理系はサイクルを組むことができない点にあります。別の言い方をすると、初期条件をどのようにつくるのかを問わなければなりません。温度一定かつ化学ポテンシャル一定の条件のもとでは、詳細釣り合いを破った初期条件に達することができないからです。

以上の論点を整理すると、

( 1 ) 蛋白質分子のアンサンブルの初期条件をどのようにおくのか

( 2 ) 生体反応において、その初期条件は実際にはどのようなメカニズムで生成されるのか

(3) 「詳細釣り合い」を破った初期条件を生成しうる状況は、エネルギー緩和時間を考慮するとき、どのようにして、どの程度の時間スケールで維持されているのか。

ということが問われるべきだろうと思います。

ちなみに、「揺動散逸定理が成立する」ための条件は何でしょうか。この問題に関しては、たとえば久保亮吾による揺動散逸定理の導出そのものに疑問を持っているため、僕自身は確たる答えを持っていません。何か知っていたら教えてください。

蛋白の折り畳みに限らず、分子レベルの情報処理に関して、「温度」が定義されない状況をも含めて想像力を働かせるべきだ、というのが僕の立場です。この場合の「温度」とは、単に環境の温度という意味ではなく、反応座標にエネルギーを供給する(一般には集団的な)一群の自由度に対して、という意味です。これを図式的に表すと、全系が、大まかに言って、以下の三種類の自由度の集合に分けられるのではないかと、という作業仮説です。

(i) 反応座標(必ずしも1次元的に考える必要はない。折り畳みの進行を記述するいくつかの自由度)

(ii) 反応座標と強く相互作用する一群の自由度

(iii) それ以外の自由度

この時、温度が定義されるのは(3)に分類される自由度に対してのみであり、実験が見ているのもこの意味での「温度」です。これに対して、蛋白質の折り畳みのダイナミクスでは、(1)と(2)の結合系が重要であり、(2)に対しては、局所平衡を仮定することはできないだろうと考えてます。この仮説の問題点は、(2)と(3)の間の相互作用による(2)の緩和時間ですが、これに関しては今の時点では何とも言えません。

また、“笹井さんの”(1)については、カオスの効果を実験的に見られるかとなると、難しいと思いますが、シミュレーションでは可能でしょう。この場合、折り畳みを記述する自由度、この自由度と強く相互作用する自由度の2種類のダイナミクスと、これら以外のダイナミクスは、動的な特性が異なっていると思います。力学的な考察が重要なのは、前者の2種類に対してですが、これらをシミュレーションのデータから、どのように腑分けするのかという問題が、現時点で最大の課題だと思います。

(2)(3)については、100万回を通して、カオスの効果が一貫して持続するという事までは期待していません。遷移状態を越えた直後のエネルギー分布は、局所平衡を破っていますから、この効果が、この後に生じる数回の遷移の間、持続すれば良いという仮説を考えています。数回の遷移の後、一旦は熱平衡に回復したとしても、大きな落差のある遷移状態を越えたときに、また局所平衡を破った状態が実現しますから、ここからさらに数回の遷移の間、動的な相関が持続するという描像を想定しています。一回一回の遷移を確率的に考えるより、たとえば数回程度の遷移で相関を考えるだけでも、効率が向上する効果は非常に大きいと思います(独立事象の確率は、積の形で効いてきますから)。

(4)については、

(a) 初期分布を「詳細釣り合い」(これが僕の意味で)を破った分布においた場合、確率過程であっても動的相関を持たせる事が可能です。しかしこの時、(i) 反応座標と熱浴の間は平衡ではない、(ii) 特に分

子レベルでは、確率的な描像の前提、即ち、時間スケール空間スケールの分離が不十分である、という2点を考えると、力学的な過程が顔を出すと考えた方が、むしろ自然なのではないかと考えます。

(b) 情報処理と非平衡性に関しては、直前に送ったメールに書きましたが、簡単に繰り返しておきます。

サイクルを構成する機関が、熱力学的な仕事を取り出すためには、温度勾配、または化学ポテンシャルの勾配が必要です(これは、熱力学の第2法則)。この時、この熱機関の効率の上限は、カルノーサイクルの効率で与えられます。サイクルを構成しない場合、環境が温度一定かつ化学ポテンシャル一定でも、過渡的な過程を利用して情報処理を行うことはできますが、この場合の情報処理は、一回だけであり繰り返すことはできません。繰り返すためには、初期条件を非平衡に設定し直すことが必要ですが、温度一定化学ポテンシャル一定の状況の下では不可能だからです。従って、この場合、初期条件をどのようなメカニズムで作るのか、そのようなメカニズムは、どの程度の時間スケールの間、持続するのか、が問われる必要があります。

(c) 仮にファネルが存在していたとしても、鎖の長さが長くなると、試行錯誤の数が指数関数的に増え、反応座標が折り畳みの全過程を通じて1次元的に近くない限り、折り畳める確率は極めて小さくなる可能性があります。

例えば、反応経路が二つに枝分かれしている場合を考えてみてください。そのどちらの通路も坂道になっていると、蛋白質はどちらの通路を通るべきか、確率的に決めるしかありません。この枝分かれが  $N$  個あれば、折り畳む確率は  $2^{-N}$  になります。 $N$  が10であれば、約1000分の1であるものが、 $N$  が30で10億分の1になります。枝分かれの数が、蛋白の長さに比例するとすると、長さが三倍になっただけで、折り畳む確率は、百万分の1に減ってしまいます。このことから、蛋白質が長い場合、ファネル描像では不十分なのではないか、と考えた次第です。

boxing foldingの問題で、Plotkin-Wolynes が overdamped の時間おくれのまさつのある Langevin 方程式を使ったのは、共感を感じます。。

へのコメントですが、僕自身は、overdamped ではなく、運動量の効果を入れたいと考えています。運動量の効果が折り畳みの全過程を通して、一貫して残ると考える必要はありません。また、実際にはそういうことは無いでしょう。緩和時間の範囲で、そのあいだ通り抜けるサドル間遷移の間、力学的な相関が効くだけでも、折り畳みの効率は劇的に向上するはずです。特に反応経路が枝分かれを起こしている場合、そのどちらを選ぶかという選択が力学的に行われれば、確率的な2者選択よりはるかに好ましいはずです。

boxing さらに、folding のオーダーパラメータとして1~2自由度を選べば、このダイナミクスは、ある構造をとったら次はこの構造にしか移れない、という幾何学的制限や相互作用からくる制限をすべて捨象した記述なので、捨てた部分は時間相関のあるまさつ、として一部とりこむことができる(完全ではないが)というわけです。

については、捨てた部分の効果が、摩擦としてのみ表現されるという事には、異議があります。熱浴の大きさ(熱容量および熱伝導率)が有限であれば、反応座標と熱浴の間のエネルギーのやり取りが、熱浴への反作用として重要となるはずです。たとえば、熱浴の温度の変化、あるいは、熱が熱浴の一部にたまるこ

とによって、一様な温度から温度勾配を生じるなど。さらに、熱力学を前提としなければ、「散逸」したエネルギーが部分的に還流する可能性も考えられます。

マクロな系では、「熱」が仕事として還流することは考えられませんが、分子レベルでは可能だと想像することはできます。むしろ、マクロな熱力学からの乖離こそが、分子レベルの情報処理のユニークな点であると考えやすそうです。

foldings のオーダーパラメータとして単純にネイティブ結合数をとるのはよくない、という小松崎さんの指摘には賛成で、捨てた自由度の効果が最小になるモードを選ぶ、という目的のために underdamped の鎖の運動を手がかりにする、というのはよい方法だと思います。実際の overdamped の蛋白質から離れて、おれたたむひもの物理、というより広い世界を想定してその中で、underdamped の鎖でよくわかる概念が overdamped の鎖にあてはまるかどうか比較する、ということは物理のスタイルとして正しい方向だと思うからです。

については、トポロジカルな制約を、力学系の記述の中でどのように表現するのか、というのは重要な課題だろうと思います。

ただ、実際の蛋白における局所平衡、詳細つりあい、機能、などの問題を考える際には、時間スケールや自由度のスケールの考察が必要だと思います。ラチェットモデルやその改良の議論には、そういう視点が抜けているので、それを蛋白に適用しようとするのは、あやうい議論のように思います。

この点については同感です。

笹井: (“戸田さんの”) (1) ~ (3) の問題設定が重要であることは同感です。蛋白質が「詳細釣り合い」を破った初期条件におかれる仕方は何通りかあって

( $\alpha$ ) 合成された直後

( $\beta$ ) 細胞内で輸送されて異なる環境におかれる

( $\gamma$ ) 蛋白質と蛋白質または蛋白質と核酸との相互作用

( $\delta$ ) 蛋白質と低分子の相互作用 (イオンやペプチド断片、ATP などが蛋白質にキャッチされる、あるいは放出される)

( $\epsilon$ ) 蛋白質が触媒して起こる化学反応の影響を受ける

( $\eta$ ) 光受容

などなど。

それぞれの過程によって特徴的な時間スケールは異なって、( $\eta$ ) はピコ秒以下、( $\alpha$ ) - ( $\delta$ ) はミリ秒から秒の過程、( $\epsilon$ ) は反応速度に依る、というわけですが、蛋白質がピコ秒から秒にわたる幅広い運動の自由度を持つために、バラエティのある応答の仕方が可能です。

( $\alpha$ ) から ( $\eta$ ) のようなことが起こるそもそもの原因は細胞が非平衡におかれているからで、細胞全体が平衡におかれている場合は、蛋白質も自発的に非平衡になって機能を発揮するというわけにはいかずに、情報素子として働かないというふうになる。

( $\alpha$ ) ( $\beta$ ) も ( $\gamma$ ) ( $\delta$ ) ( $\epsilon$ ) の組み合わせですから、( $\eta$ ) をさておくことにすれば ( $\gamma$ ) ( $\delta$ ) ( $\epsilon$ ) の細胞サイズのダイナミクスによって「詳細釣り合い」が破れたり、緩和して局所平衡に接近したり、とシステム全体の論理を考えることは生命の理論として非常に大事な目標だと考えます。

ちなみに、「揺動散逸定理が成立する」ための条件は何でしょうか。この問題に関しては、たとえば久保亮吾による揺動散逸定理の導出そのものに疑問を持っているため、僕自身は確たる答えを持っていません。何か知っていたら教えてください。

そういうふう考えたことはありませんでした。「ほっておけば平衡に達することが保証されている過程であり、過程全体を通して温度がよく定義されている」という程度の意味で使ったのですが、考えが浅いかもしれません。

この時、温度が定義されるのは (iii) に分類される自由度に対してのみであり、実験が見ているのもこの意味での「温度」です。これに対して、蛋白質の折り畳みのダイナミクスでは、(i) と (ii) の結合系が重要であり、(ii) に対しては、局所平衡を仮定することはできないだろうと考えてます。。。

の点も同感です。folding のような大規模な変化に関しては基本的に (i) と (ii) は分離できないのだろうと思います。けど、(ii) は全自由度の 1 % 程度で (iii) が全系のほとんどの自由度をしめるので、(i) と (ii) はその温度を感じながらゆっくり運動する、局所平衡になかなか達しない自由度として記述できる。(iii) はすばやく (folding のスケールで見ると) 局所平衡に達するといつてよいので、folding 過程全体を記述する態度のときは、温度は均一とみなしてよい、と思います。

ナノ秒程度での小規模な構造変化では、(ii) の変化の程度が小さいので、もしかしたら (ii) の緩和は比較的速いと思ってもよいかもしれない。けれども、これは確かにわからないことです。

遷移状態を越えた直後のエネルギー分布は、局所平衡を破っていますから、この効果が、この後に生じる数回の遷移の間、持続すれば良いという仮説を考えています。数回の遷移の後、一旦は熱平衡に回復したとしても、大きな落差のある遷移状態を越えたときに、また局所平衡を破った状態が実現しますから、ここからさらに数回の遷移の間、動的な相関が持続するという描像を想定しています。

については、数回の遷移の間、動的な相関が持続するかどうか、というのは大事なチャレンジングな問題だと思います。

(c) 仮にファネルが存在していたとしても、鎖の長さが長くなると、試行錯誤の数が指数関数的に増え、反応座標が折り畳みの全過程を通じて 1 次元的に近くない限り、折り畳める確率は極めて小さくなる可能性があります。

例えば、反応経路が二つに枝分かれしている場合を考えてみてください。そのどちらの通路も坂道になっていると、蛋白質はどちらの通路を通るべきか、確率的に決めるしかありません。この枝分かれが  $N$  個あれば、折り畳む確率は  $2^{-N}$  になります。 $N$  が 10 であれば、約 1000 分の 1 であるものが、 $N$  が 30 で 10 億分の 1 になります。枝分かれの数が、蛋白の長さに比例するとすると、長さが三倍になっただけで、折り畳む確率は、百万分の 1 に減ってしまいます。

このことから、蛋白質が長い場合、ファネル描像では不十分なのではないか、と考えた次第です。

ファネル (漏斗) 仮説とは、反応経路にそって進むにつれて、枝分かれ (エネルギー的に遷移が可能な経路の) が少なくなり、漏斗のように行く先が収斂するように、ポテンシャル面がデザインされている、とい

う仮説です。ですから、上でおっしゃっているのはファネル描像ではない、のとちがいます？

鎖の長さが長くなると、経路のデザインがよりうまくなされないといけないのは同意しますが、それがエネルギー的に（ファネル描像で）ではなく、力学的になされないといけない、という根拠はまだないと思います。（力学的にされているかもしれないけれど）

緩和時間の範囲で、そのあいだ通り抜けるサドル間遷移の間、力学的な相関が効くだけでも、折り畳みの効率は劇的に向上するはずで。特に反応経路が枝分かれを起こしている場合、そのどちらを選ぶかという選択が力学的に行われれば、確率的な2者選択よりはるかに好ましいはずで。

これはそうかもしれないし、そうでないかもしれません。たとえば、反応経路が広い範囲から徐々に収斂するときは反応速度が速いのですが、反応経路が急に狭まるとかえって遅くなります。そのボトルネックまでトラジェクトリがなかなか到達しないからです。

捨てた部分の効果が、摩擦としてのみ表現されるという事には、異議があります。熱浴の大きさ（熱容量および熱伝導率）が有限であれば、反応座標と熱浴の間のエネルギーのやり取りが、熱浴への反作用として重要となるはずで。たとえば、熱浴の温度の変化、あるいは、熱が熱浴の一部にたまることによって、一様な温度から温度勾配を生じるなど。さらに、熱力学を前提としなければ、「散逸」したエネルギーが部分的に還流する可能性も考えられます。

それは大いにあり得ると思います。そういう作用反作用は10ピコ秒のオーダーで繰り返し、ナノ秒のオーダーで緩和するので、ナノ秒以下のできごととしては重要です。ナノ秒の過程はより長い過程の素過程なので、より長い過程にとっては、経路を制限する、あるいは遷移の時間スケールやモード間相互作用の強さを決める、という意味では重要です。あるいは、10ナノ秒まつと1から10回程、小規模な構造変化を起こす（サドルを越える）ので、その過程が機能に直接関わるような生理現象にとっては基本的に重要な可能性があります。ミリ秒の間には、熱浴の構造が変わってしまう、溶媒に変化があったり他の分子が接近したりするかもしれませんから、そういう粗視化された意味での作用反作用がありうると思います。

おまけですが、分子レベルの情報処理のユニークな点で重要、と私が思う2点は、

(A) ナノ秒からミリ秒というメゾスコピックの運動が遺伝情報によってデザインされたポテンシャル面で起こる。そのようなデザイン原理はよくわからないし、仮にわかったとしても、そのようなデザインに基づいて有機化学や1分子技術で分子を人工的に合成しようと思うと、えらいエネルギーを注入して強い非平衡を利用しないとできないが、生体系の方法では高い効率で実現される。それで全体がゆるい非平衡の環境でシステムティックにうごくことができる。

(B) 蛋白質と他分子の相互作用の時間スケールもまた、メゾスコピックなスケールで起こるので、1分子内の情報処理とカップルしたできごととして複数分子間の情報処理も進行しうる。ナノ秒からミリ秒という時間スケールの運動に構造があるおかげで、ナノ秒以下の原子レベルの現象とミリ秒以上の細胞レベルの現象の橋渡しがされる。

分子内、分子間のメゾスコピックの運動が重要、という主張は物理学者にとっては常識的な主張だと思うけれど、分子生物学者、生化学者にとっては非常識な主張で、普通は、X線で見られるような構造がすべてを決めていると思われています。

戸田:

「ほっておけば平衡に達することが保証されている過程であり、過程全体を通して温度がよく定義されている」という程度の意味で使ったのですが、考えが浅いかもかもしれません。

ですが、ほっておけば平衡に達するというのは、揺動散逸定理が成り立つ領域より、はるかに広いと思います。たとえば乱流状態でも、外からのエネルギー注入を切って放置しておけば、一様な平衡状態になりますが、マクロな渦が消え去っていない場合には、たとえ流体の各部分に対して局所的に温度が定義されていたとしても、揺動散逸定理が成り立つと思われる線形非平衡状態にはありません。

ファネル(漏斗)仮説とは、反応経路にそって進むにつれて、枝分かれ(エネルギー的に遷移が可能な経路の)が少なくなり、漏斗のように行く先が収斂するように、ポテンシャル面がデザインされている、という仮説です。ですから、上でおっしゃっているのはファネル描像ではない、のとちがいます?

仮にファネルの構造を、分岐があるかもしれない初期と、完全に一本道となる後期に分けるとします。この時、ファネルの構造が、蛋白の長さの何らかの巾によってスケールされるとすると、蛋白が長くなるにつれて初期段階の長さが長くなるので、前回の僕の議論はやはり成り立つと思います。

従って、ファネルの描像を、長い蛋白に適用するためには、蛋白が長くなっても、ファネルの初期段階の長さは変わらず、後期の長さだけが長くなる必要があります。しかし、ファネルの構造をつくっている力の到達距離を考えると、このようなことは不自然に思われますがどうでしょうか。

鎖の長さが長くなると、経路のデザインがよりうまくなされないといけないのは同意しますが、それがエネルギー的に(ファネル描像で)ではなく、力学的になされないといけない、という根拠はまだないと思います。(力学的にされているかもしれないけれど)

「力学的に」というのは、確かに今の段階では、作業仮説の一つです。

これはそうかもしれないし、そうでないかもしれません。たとえば、反応経路が広い範囲から徐々に収斂するときは反応速度が速いのですが、反応経路が急に狭まるとかえって遅くなります。そのボトルネックまでトラジェクトリがなかなか到達しないからです。

「反応経路が急に細くなると反応速度が遅くなる」というのは、ランダムな揺動の下でのエントロピー障壁の考え方ですが、力学的には「エントロピー障壁」の考えには異議があります。その理由は、「エントロピー障壁」が、「反応経路の細さ」のように、局所的な量でとらえられているからです。本来は、或る遷移状態を越えるときの力学的条件と、次の遷移状態を越える時の力学的条件の相関という非局所的な物理量で記述されるはず(これが、動的相関に他なりません)。

「これが、局所的な量で置き換えられるための条件は何か」という問いを考える必要があると思います。

おまけですが、分子レベルの情報処理のユニークな点で重要、と私が思う2点は、。。。

確かに構造解析が重視されているようですが、最近の水谷さん(神戸大)のように、構造の動きが機能にとって重要である、という人達もいます。(水谷さんを、生化学者と言えるかどうかはわかりませんが)僕も、このような方向を進めることには賛成です。

笹井:

ほっておけば平衡に達するというのは、揺動散逸定理が成り立つ領域より、はるかに広いと思います。たとえば乱流状態でも、外からのエネルギー注入を切って放置しておけば、一様な平衡状態になりますが、マクロな渦が消え去っていない場合には、たとえば流体の各部分に対して局所的に温度が定義されていたとしても、揺動散逸定理が成り立つと思われる線形非平衡状態にはありません。

極端な言い方が許されるとすれば、非定常な宇宙の中に存在するものはすべて平衡に達していません。でも、そういう言い方は正しくなくて、線形非平衡なのかそうでないのか、あるいは平衡なのかそうでないのか、という議論は注目している自由度の範囲や時間スケールによって変わる問題なのだと思います。上の乱流のシステムでも液体のメソスコピックな速度論のレベルでは線形非平衡の仮定から理論を出発させることができるレベルがあるのと違いますやろか?(遷移状態ののりこえ、というふうに液体の分子運動をとらえるときは、非線形非平衡として考えないといけないのでしょうか)

細胞は基本的に非線形非平衡系なので、細胞でおきる現象にはすべて揺動散逸定理が成りたない、と言い切ることは簡単にできませんが、注目しているスケールによっては(メソスコピックなスケールがうまく定義できれば)、散逸するエネルギーと熱ゆらぎによるエネルギーの注入とが近似的にバランスがとれていて、その比として温度が定義できるという現象があるかどうか、という問題を考えないといけないのだと思います。あるスケールにおいてそうしたことが成り立っているということと、よりマクロなスケールでは線形非平衡が破れていてそのために機能や情報処理が可能である、ということは両立しうるのだと思います。もちろん、この2つのスケールがそう簡単に分かれないうところに本質があるのだとは思いますが。

中間のメソスコピックな領域が存在することを考えれば、よりマクロなスケールで非線形非平衡である、ということと、遷移状態ののりこえというミクロな分子スケールでは非線形非平衡になっている、ということとをすぐに簡単に結びつけるわけにはいかない(結びついている可能性も除外できないけれど)はずで

仮にファネルの構造を、分岐があるかもしれない初期と、完全に一本道となる後期に分けるとします。この時、ファネルの構造が、蛋白の長さの何らかの巾によってスケールされるとすると、蛋白が長くなるにつれて初期段階の長さが長くなるので、前回の僕の議論はやはり成り立つと思います。従って、ファネルの描像を、長い蛋白に適用するためには、蛋白が長くなっても、ファネルの初期段階の長さは変わらず、後期の長さだけが長くなる必要があります。しかし、ファネルの構造をつくっている力の到達距離を考えると、このようなことは不自然に思われますがどうでしょうか。

ファネルの描像とは、反応経路にそって進むにつれて枝分かれが徐々に少なくなるエネルギー面を考慮することであり、Levinthal 的な初期と完全にコントロールされた後期にわかれていて Levinthal 的な初期が律速だ、という描像ではありません。ファネル描像の物理的基盤は郷信広氏が70年代に言い出したコンシステンシー原理ですが[20]、それは、蛋白質から任意に取り出したある部分がネイティブ構造に近づけばその分だけエネルギーが下がる、というふうに相互作用がコンシステントになる特別なデザインがされている、という主張です。従って、理想的なファネルでは、急に反応経路が狭くなるのではなく、少し構造ができれば少しエネルギーが下がり反応経路の幅も少しせまくなる、というふうになっています。そうすれば、枝分かれの問題を回避できる、という主張です。おっしゃっている議論の中で「ファネルの描像」と表現されているのはファネルの描像とは違うものではないですか?

「力学的に」というのは、確かに今の段階では、作業仮説の一つです。

この作業仮説を否定する材料は今のところ見出されていないし、この作業仮説が本当なら、それがもたらす蛋白質の物性や機能にとっての意味を考えることは非常に大事だ、ということまで賛成します。興味深い研究テーマだと思いますし、Wolynes が”Do it!”と言ったのももっともだと思います。

しかし趣意書では、この作業仮説を考える必然性として仮説をサポートする根拠がいくつか示されていますが、それらは論理的に誤りを含んでいるように思える、というのが私の感想です。

「反応経路が急に細くなると反応速度が遅くなる」というのは、ランダムな揺動の下でのエントロピー障壁の考え方ですが、力学的には「エントロピー障壁」の考えには異議があります。その理由は、「エントロピー障壁」が「反応経路の細さ」のように、局所的な量でとらえられているからです。本来は、或る遷移状態を越えるときの力学的条件と、次の遷移状態を越える時の力学的条件の相関という非局所的な物理量で記述されるはず（これが、動的相関に他なりません）。「これが、局所的な量で置き換えられるための条件は何か」という問いを考える必要があると思います。

力学的な動的相関がエントロピー障壁の考えと同じでない、というのはわかりましたがなぜ力学的な動的相関ならフォールディングを加速するのか、というのはいくつかよくわかりません。（そういう可能性はある、というのではなくて、そうなるはずである、というのはいくつか納得できへん）

戸田:

極端な言い方が許されるとすれば、非定常な宇宙の中に存在するものはすべて平衡に達していません。でも、そういう言い方は正しくなくて、線形非平衡なのかそうでないのか、あるいは平衡なのかそうでないのか、という議論は注目している自由度の範囲や時間スケールによって変わる問題なのだと思います。上の乱流のシステムでも液体のメソスコピックな速度論のレベルでは線形非平衡の仮定から理論を出発させることができるレベルがあるのと違いますやろか？（遷移状態ののりこえ、というふうに液体の分子運動をとらえるときは、非線形非平衡として考えないといけなんでしょうが）

その通りだと思います。乱流においても、個々の流体粒子は局所平衡にあり、従って温度が定義されます。しかし、乱流を記述する、たとえば渦のような集団自由度は局所平衡になく、従って、これらの自由度は、揺動散逸定理の適用外にあります。

細胞は基本的に非線形非平衡系なので、細胞でおきる現象にはすべて揺動散逸定理が成り立たない、と言い切ることは簡単にできますが、注目しているスケールによっては（メソスコピックなスケールがうまく定義できれば）、散逸するエネルギーと熱ゆらぎによるエネルギーの注入とが近似的にバランスがとれていて、その比として温度が定義できるという現象があるかどうか、という問題を考えないといけなないのだと思います。あるスケールにおいてそうしたことが成り立っているということと、よりマクロなスケールでは線形非平衡が破れていてそのために機能や情報処理が可能である、ということは両立しうるのだと思います。もちろん、この2つのスケールがそう簡単に別れないところに本質があるのだとは思いますが。問題は、蛋白質の折り畳みを記述する集団自由度が、乱流の比喻で言うと、個々の流体粒子と同様な状況なのか、それとも、乱流における渦のような集団自由度のように、揺動散逸定理の適用外にあるのか、という点です。僕の立場は、折り畳みの全過程において、いつでも言うわけではなからうが、揺動散逸定理の適用外に出る場合もあるのではないかと、という作業仮説を考えたいという事です。

中間のメソスコピックな領域が存在することを考えれば、よりマクロなスケールで非線形非平衡である、ということと、遷移状態ののりこえというミクロな分子スケールでは非線形非平衡になっている、ということとをすぐに簡単に結びつけるわけにはいかない(結びついている可能性も除外できないけれど)はず  
です。

全くその通りです。マクロな非線形非平衡と同一視する事はできません。それと同程度に、マクロな線形非平衡とも同一視はできないだろうと考えています。それが、メソスケールの面白さではないでしょうか。

ファネルの描像とは、反応経路にそって進むにつれて枝分かれが徐々に少なくなるエネルギー面を考えることであり、Levinthal 的な初期と完全にコントロールされた後期にわかれていて Levinthal 的な初期が律速だ、という描像ではありません。ファネル描像の物理的基盤は郷信広氏が70年代に言い出したコンシステンシー原理ですが、それは、蛋白質から任意に取り出したある部分がネイティブ構造に近づけばその分だけエネルギーが下がる、というふうに相互作用がコンシステントになる特別なデザインがされている、という主張です。従って、理想的なファネルでは、急に反応経路が狭くなるのではなく、少し構造ができれば少しエネルギーが下がり反応経路の幅も少しせまくなる、というふうになっています。そうすれば、枝分かれの問題を回避できる、という主張です。おっしゃっている議論の中で「ファネルの描像」と表現されているのはファネルの描像とは違うものではないですか？

初期と後期と言う形で分けたのは、議論を簡単にするための極論です。反応経路に沿って進むにつれて、枝分かれが徐々に少なくなるエネルギー面でも同様の議論ができます。この場合でも、ファネルの枝分かれ構造が、蛋白質の長さに対して、どのようにスケールされるかを考えれば良いと思います。仮に、枝分かれ構造が、蛋白質の長さに対してユニバーサルな形でスケールされると仮定します。たとえば、枝分かれの総数を  $y$ 、蛋白質の長さを  $N$  として、

$$y = C * N^a \quad (1)$$

と書けると仮定すると、 $a$  がゼロに近くない限り、 $N$  が大きくなると枝分かれの数  $y$  は増大します。この時、正しく折り畳む効率は、個々の枝分かれを独立な過程だとすると、 $1/(y$  の指数関数) の形で減少します。従って、以上の前提に立つ限り、長い蛋白質に対しては、困難が増大すると思います。

しかし趣意書では、この作業仮説を考える必然性として仮説をサポートする根拠がいくつか示されていますが、それらは論理的に誤りを含んでいるように思える

「論理的に誤りを含んでいる」というのは納得が行きませんので、指摘してください。

力学的な動的相関がエントロピー障壁の考えと同じでない、というのはわかりましたがなぜ力学的な動的相関ならフォールディングを加速するのか、というのはいくつか示されています。(そういう可能性はある、というのでなくて、そうなるはずである、というのはいくつか示されています)

力学的に考えれば、自動的に効率が良くなるわけではなく、悪くなる場合もあります。従って、デザインが重要であることに違いはありません。良くデザインがされていれば、たとえば2ヶ所枝分かれがあったときに、確率過程では、効率が4分の1になるところを、増やせるだろうという事です。即ち、最初の枝分かれは確率的だとして、最初の枝分かれで正しい道を選んだときには、2分の1より大きい割合で、次の枝分かれを正しく通りすぎるような動的相関があれば(動的相関の存在そのものは、デザインの結果です)、効率は上がるだろうということです。

笹井:

$a$  がゼロに近くない限り、 $N$  が大きくなると枝分かれの数  $y$  は増大します。この時、正しく折り畳む効率は、個々の枝分かれを独立な過程だとすると、 $1/(y$  の指数関数) の形で減少します。従って、以上の前提に立つ限り、長い蛋白質に対しては、困難が増大すると思います。

ファネルは枝分かれの構造がエネルギーによってデザインされている、と考える描像なので個々の枝分かれは均等ではありません。枝分かれが多くてもトラジェクトリーはエネルギーの下がる少数の枝の方向に流れていきます。幾何学的に可能な経路の数は、 $y$  の指数関数で増加しますが、それらは均等に選ばれるのではなく、エネルギー的バイアスによって選ばれるため、効率は  $1/(y$  の指数関数) の形で減少するわけではありません。

系が大きくなると考え得る空間は急激に増大しますが、理想的なファネルの場合、その効果は次のようにあらわれます。どこからどんな経路をたどっても、1本1本のトラジェクトリーは迅速に緩和する。ただし、多数の分子のアンサンブルを考えたとき、分子ごとにいろんな緩和をする、というトラジェクトリーの多様性が急激に増大する、というふうになります。

強磁性イジング系は理想的なファネルをさらに戯画化したものですが、戸田さんの議論に従うと、強磁性イジング系も系を大きくすると決して緩和しない、という結論になってしまうけれど、そんなことはありません。マクロな系の緩和はマクロな時間かかるけれど、つまり  $N$  の多項式時間はかかるけれど、指数で遅くなって緩和が不可能になる、ということは起こりません。

実際の蛋白質は理想的なファネルを持っていなくてローカルミニマムがあります。長い鎖に対してはローカルミニマムの個数が増えて困難が増大するのは、そのとおりだと思います。長い蛋白質は、したがってうまくデザインされていないといけません。まったくデザインされていない鎖では、ミニマムの数が  $N$  の指数で増えて、効率は著しく落ちます。それで、ミニマムの数が少ない、あるいはあっても浅くて、ファネルの勾配のほうが大きいというエネルギー的なデザインが必要になる、というのがファネル理論のエッセンスですが、そのようなエネルギー的なデザインによるものでは不十分で、力学系的になっているはずだ、とする論拠はいまのところあるように思えません。(力学系的になっていない、という論拠もないけれど)

「論理的に誤りを含んでいる」というのは納得が行きませんので、指摘してください。

力学系的な発想でおれたたみを見直すことには賛成します。でも、趣意書は多くの人、とくに学生に影響を与え得るので、レフェリーになった気分であえて批判的に読んでいます。趣意書では、次のような理由からファネル描像を越えて、力学系的な描像が必要になる、という根拠が挙げられていたと思います。

- (1) 折れ畳みのダイナミックスは、漏斗型エネルギー地形上をランダムに滑り落ちていくような(単純な)描像では解釈しきれない部分が多いことが、最近指摘されている。
- (2) アミノ酸残基の総数が増大すればするほど、考え得る状態空間は急激に増大するため、単純なファネル型描像(ファネル型ポテンシャル地形上の乱歩問題)では捉えきれない、(限定された)ダイナミカルな経路が、生体高分子としての折れ畳みの機能(すなわち、効率性・頑健性)に重要な役割を果たしているという可能性が考えられる。

(1) の指摘が Garcia と Plotkin-Wolynes だとすれば、Garcia はサドルの乗り越えが普通の拡散過程でないと指摘したのだけど、複数のサドルの乗り越えに動的相関があるかどうか、という問題につながるかどうかはまだわからないし、まして、ファネル描像にどう関係を持つかはまだ明らかではない。Plotkin-Wolynes はイントロで格子模型の鎖の動きは、あるときは拡散的に見えたり、あるときは弾道的に見える、と言っているのですが、格子模型でもあり得る動的相関のことを調べていて力学系的な問題とは直接は関係しません。

(2) は上にも書いたとおりですが、考え得る状態空間が急激に増大するからと言ってファネル描像では不十分になる、という論拠はないと思います。

力学的に考えれば、自動的に効率が良くなるわけではなく、悪くなる場合もあります。従って、デザインが重要であることに違いはありません。

良くデザインがされていれば、たとえば2ヶ所枝分かれがあったときに、確率過程では、効率が4分の1になるところを、増やせるだろうという事です。即ち、最初の枝分かれは確率的だとして、最初の枝分かれで正しい道を選んだときには、2分の1より大きい割合で、次の枝分かれを正しく通りすぎるような動的相関があれば(動的相関の存在そのものは、デザインの結果です)、効率は上がるだろうということです。

悪くデザインされていれば、エントロピー障壁と同じ効果をもたらすのだけど良くデザインされていれば、力学系的な理由で効率がよくなることがある、というふうに思えます。よいデザインとは具体的にどんなものか、は興味のあるところです。

小松崎:ちょっと忙しくしていたので、ずっと聞き手になっていました。すみませんでした。僕自身が二人のやり取りのなかから、幾つか選択して自分なりの意見を述べたいと思います。

#### 1. Folding のレベルまでは100万回ほどサドルを越える過程でカオスが残らないという議論

笹井さんの意見は、サドルを100万回も越える過程で動的相関が残存しているのは信じがたいと指摘されましたが、それは僕も同感で、如何なるスケールでも100万回もサドルを越える全過程を通じて、memoryが残るとは思いません。ここで、僕が考えたいことは、ミクロな分子振動の時間スケールの運動ではなくて、ゆっくりした集団運動の、しかも粗視化されたスケールの運動です。ここでの「粗視化」は、ゆっくりした集団座標の精度は「ある有限のサイズ」内で評価することを指すと考えてもらえば良いです。例えば、Garciaの各温度における水中の酸化チトクロームcの運動を主成分座標1, 2で張られる2次元平面に投影したトラジェクトリーを眺めてみると、他の自由度空間に無数に存在するであろう小さいサドルは確かに何百、何千回と越えているであろうが、ベイスン間の遷移という粗視化したスケールで眺めれば、数回の“サドル”越え(=ベイスン間遷移)として解釈することができます。100psより長い時間スケールで観測された弾道的な異常拡散は力学的な過程であることを示唆していて、有限サイズの精度におけるリヤプノフ指数を主成分に沿って求めれば、ミクロには強いカオスであるが、粗視化されたスケールでは弱いカオスであることを示すものと期待しています。つまり、笹井さんの意見にあるように、

細胞は基本的に非線形非平衡系なので、細胞でおきる現象にはすべて揺動散逸定理が成りたない、と言い切れることは簡単にできますが、注目しているスケールによっては（メゾスコピックなスケールがうまく定義できれば）、散逸するエネルギーと熱ゆらぎによるエネルギーの注入とが近似的にバランスがとれていて、その比として温度が定義できるという現象があるかどうか、という問題を考えないといけないのだと思います。あるスケールにおいてそうしたことが成り立っているということと、よりマクロなスケールでは線形非平衡が破れていてそのために機能や情報処理が可能である、ということは両立しうるのだと思います。もちろん、この2つのスケールがそう簡単に別れないところに本質があるのだとは思いますが。

と同様に、ミクロには強いカオスで、何千、何万回とサドルを交差するためミクロレベルでは動的相関は消失するが、空間スケールのより大きい粗視化されたスケールでは、何回、何十回“サドル”を越える間に部分的に動的相関が残っていて、それが折れ畳みの効率の良さに関連する可能性はあり得ると思います。

笹井:実際の蛋白における局所平衡、詳細つりあい、機能、などの問題を考える際には、時間スケールや自由度のスケールの考察が必要だと思います

どのような時間スケールを考えているのかだけでなく、どのような空間スケールおよび粗視化スケールを考えているのかも議論する必要があって、必ずしも「エネルギー面の（分子レベルでのミクロな）サドルを越える運動が起こる  $10^{-10}$  秒から  $10^{-9}$  秒のできごと」だけでなく、「エネルギー面の（粗視化された大きいスケールでの）サドルを越える運動が起こる、更に長い時間領域のできごと」でも、力学系のカオスの構造が運動に現れる可能性はあると思います。 $10^{-3}$  秒 から  $10^1$  秒の間に生起する「100万」回のサドル交差の間には、動的相関は残らないと考えるのはもっともですが、こういった座標に沿ってダイナミクスを見るか（座標の組換えも含め）、どのような空間スケールで、どのような粗視化スケールでダイナミクスを議論するのかに依存するはずで、100万という試算が、例えば、各 C-C 結合周りの回転異性の積み重ねといった試算ならば、実際に系が感じる、実効的なベイスン間遷移の数はもっと遥かに少ないかもしれません。無論、粗視化のスケールを極端に大きく設定しても意味のあるダイナミクスを抽出することはできませんので、どのように重要な集団座標の切り出し、粗視化スケールを設定するかといった問題がもっとも重要です。もちろん、笹井さんが指摘してくれたように、それでもカオスの構造があるか否かは決して自明ではなくて、もし、カオスのコヒーレンスが現れていたなら、それが構造ゆらぎを通じて蛋白質の機能としてどのような意味を持つか、を考える必要があります。

現実的に、ミクロなサドルを通過する間の動的相関は機能などが生起する時間スケールよりも遥かに短い時間領域で消失するであろうから、考えても意味がないと思います（多谷遷移の相構造に関する基礎論を展開することは意味がありますが）。しかし、より大きい空間スケールの集団運動の、粗視化されたスケールでの、多谷遷移の動的相関は残っている可能性はあり得ると思いますし、それがミクロな空間スケールで生起する化学反応とどのように繋がっているかを議論する意味はかなり大きいと思います。

## 2. 温度の議論

戸田：この時、温度が定義されるのは (iii) に分類される自由度に対してのみであり、実験が見ているのもこの意味での「温度」です。これに対して、蛋白質の折り畳みのダイナミクスでは、(i) と (ii) の結合系が重要であり、(ii) に対しては、局所平衡を仮定することはできないだろうと考えてます。。。。

笹井：同感です。folding のような大規模な変化に関しては基本的に (i) と (ii) は分離できないのだろうと思います。だけど、(ii) は全自由度の 1 %程度で (iii) が全系のほとんどの自由度をしめるので、(i) と (ii) はその温度を感じながらゆっくり運動する、局所平衡になかなか達しない自由度として記述できる。(iii) はすばやく (folding のスケールで見ると) 局所平衡に達するといつてよいので、folding 過程全体を記述する態度のときは、温度は均一とみなしてよい、と思います。

上述の「(ii) は全自由度の 1 %程度」という試算はどのようにされたのでしょうか？(i) の反応座標を切り出すこと自体、まったく非自明であって、(native contact 数などでは捉えられない) 折れ畳みのダイナミクスの本質を記述する座標が分からない以上、「反応座標と強く相互作用する一群の自由度」の評価も同程度に非自明だと思うし、その 1 %を単純に数の原理から無視してなぜ良いのか僕は正直わかりません。“folding 過程全体を「記述する態度」のときは、温度は均一とみなしてよい”というのに異論はないですが、「記述すること」と「理解すること」は必ずしも同義ではないと思っています。例えば、良く知られている化学反応の再交差問題は、一般化ランジュバンタイプの方程式でも、位相空間内に埋もれている動力学的な弾道的経路に沿った力学系カオスでも、記述することはできます [21, 22, 23] が、なぜ再交差を起こすのかということを理解する、という立場をとるならば、態度は変わってきます。1 次元的な“ある適当な反応座標”を定義して、overdamped の時間おくれのまさつのある Langevin 方程式による運動の記述は、概ね妥当だと思いますが、「その反応座標をどのように選別できたのか？温度として繰り返すことが出来ない、局所平衡の仮定が破れている（であろう）1 %の自由度を無視できる条件は何か？」という問題を抜きにして、僕は理解した感じがしないのですが。

その 1 %を摩擦として押し込められるか否かも非自明であって、

戸田：捨てた部分の効果が、摩擦としてのみ表現されるという事には、異議があります。熱浴の大きさ（熱容量および熱伝導率）が有限であれば、反応座標と熱浴間のエネルギーのやり取りが、熱浴への反作用として重要となるはずで、たとえば、熱浴の温度の変化、あるいは、熱が熱浴の一部にたまることによって、一様な温度から温度勾配を生じるなど。さらに、熱力学を前提としなければ、「散逸」したエネルギーが部分的に還流する可能性も考えられます。

笹井：それは大いにあり得ると思います。そういう作用反作用は 10 ピコ秒のオーダーで繰り返し、ナノ秒のオーダーで緩和するので、ナノ秒以下のできごととしては重要です。

この時間スケールの評価も運動を粗視化することによって変わりえるはずで、理解したい現象がある場合に、どのような自由度スケール、粗視化スケールで熱というもの、運動というものを捉えれば良いかということだと思います。

### 3. ファネル描像、分岐の問題

僕も戸田さん同様に、分岐の各点で、袋小路に落ちない方向にだけ、選択的にエネルギー的バイアスが存在すると考えるファネル理論が非現実的であるように第一印象としては、持ってしまいます。か

という、力学系的であるかもしれないというのも同程度にデザインの問題ですが、 笹井さんに教えていただきたいのは、

戸田:「理想的なファネル」では、強磁性イジング系と同じく、枝分かれがあったとしても、それが折り畳みの袋小路にならない、と考えられているように見受けられますが、蛋白質が紐状の分子で、トポロジカルな制約がある事を考えると、非現実的であるように思います。  
笹井:トポロジカルな制約が問題になるのはその通りだと思います。実際の蛋白質では、2次構造、モジュール、ドメインなどの局所構造や、しばしば現れる対称性のある構造は袋小路を減らすためのトポロジカルなデザインである可能性が高いと思います。

の文章で、2次構造、モジュール、ドメインなどの局所構造や対称性のある構造が、袋小路を減らしたり（分岐のところで選択的にある限定された方向だけにエネルギー的バイアスを保有させたり）するデザインであると考えられる理由を分かり易く説明してもらえたらと幸いです。特に分岐近傍での選択的なエネルギーバイアスはローカルなものでなければならぬはずで（でなければ、一旦間違った袋小路にであってから戻らないとなります）、そういった分岐近傍でのエネルギー地形が「2次構造、モジュール、ドメインなどの局所構造や対称性のある構造」に由来すると考えられるのはなぜなのでしょう？

笹井:まず、(1)ですが、

。。。ミクロには強いカオスで、何千、何万回とサドルを交差するためミクロレベルでは動的相関は消失するが、空間スケールのより大きい粗視化されたスケールでは、何回、何十回“サドル”を越える間に部分的に動的相関が残っていて、それが折れ畳みの効率の良さと関連する可能性はあり得ると思います。。。実効的なベイスン間遷移の数はもっと遥かに少ないかもしれませんが。無論、粗視化のスケールを極端に大きく設定しても意味のあるダイナミクスを抽出することはできませんので、どのように重要な集団座標の切り出し、粗視化スケールを設定するかといった問題がもっとも重要です。。。同様に、現実的に、ミクロなサドルを通過する間の動的相関は機能などが生起する時間スケールよりも遥かに短い時間領域で消失するであろうから、考えても意味がないと思います（多谷遷移の相構造に関する基礎論を展開することは意味がありますが）。しかし、より大きい空間スケールの集団運動の、粗視化されたスケールでの、多谷遷移の動的相関は残っている可能性はあり得ると思いますし、それがミクロな空間スケールで生起する化学反応とどのように繋がっているかを議論する意味はかなり大きいと思います。

Garcia が議論したナノ秒程度の間におこる遷移については、ちょうど小松崎さんがおっしゃった状況になっていると思います。小さいサドルの乗り越えはピコ秒以下の程度で頻繁におこっていますから、それが多数回起こっているうちに、大きなサドルの乗り越え（サドル領域を通過する乗り越えそのものに要する時間はピコ秒程度）にカオスのコヒーレンスが現れるという状況がありうると思います。サドルの乗り越えの集団運動の方向の運動量や慣性を考えることが重要だと思います。ミリ秒程度のフォールディングでは、粗視化してミリ秒程度の運動に対応する実効的なベイスン（自由エネルギーの谷という意味で）を考えることは可能だと思いますが、そのベイスンを表現する集団座標で運動量が意味のある量として書けるというふうには思えません。蛋白質と水を含む系の調和解析をすれば、もっとも遅い固有振動はピコ秒程度なので、ミリ秒程度の現象に関しては、運動量が顕に現れない、overdamped になっている、と考えたほうがよいと思います。もちろん、仮想的に underdamped の鎖のフォールディングを考えることは、集

団座標の発見という手段に使える、など物理として有用なことだと予想します。

(2)の

。。。上述の「(ii)は全自由度の1%程度」という試算はどのようにされたのでしょうか？

ですが、 $10^2$  のオーダーのアミノ酸がつながった蛋白質は  $10^3$  のオーダーの原子を含んでおり、まわりの溶媒を含めると  $10^4$  から  $10^5$  のオーダーの原子が強くカップルして動く系だと思われます。フォールディングを記述するのが蛋白質の主鎖の動きだとすると、 $10^2$  程度の自由度で記述されるはずであり、 $10^4$  に比べると1%程度、と表現しました。

(i)の反応座標を切り出すこと自体、まったく非自明であって、(native contact 数などでは捉えられない)折れ畳みのダイナミクスの本質を記述する座標が分からない以上、「反応座標と強く相互作用する一群の自由度」の評価も同程度に非自明だと思うし、その1%を単純に数の原理から無視してなぜ良いのか僕は正直わかりませんその1%を摩擦として押し込められるか否かも非自明であって、。。。。

の点は小松崎さんに全く同感です。1%を無視して1つのオーダーパラメータで表現するのは乱暴な話であり、近似として意味があることだとは思いますが、その近似で落ちている大事なことがたくさんあると思います。また、オーダーパラメータの定義も native contact でよいということはないと思います。

(3)の

2次構造、モジュール、ドメインなどの局所構造や対称性のある構造が、袋小路を減らしたり(分岐のところで選択的にある限定された方向だけにエネルギー的バイアスを保有させたり)するデザインであると考えられる理由を分かり易く説明してもらえたらと幸いです。特に分岐近傍での選択的なエネルギーバイアスはローカルなものでなければならぬはずで(でなければ、一旦間違った袋小路にであってから戻らないとなります) そういった分岐近傍でのエネルギー地形が「2次構造、モジュール、ドメインなどの局所構造や対称性のある構造」に由来すると目されるのはなぜなのでしょう？

については、シートやヘリックスなどの規則的な2次構造は、例えばある部分の水素結合ができれば立体的規制ができて、その結果、そのまわりも水素結合ができやすくなる、など協同的に構造ができるという仕方袋小路をさける役割を果たしていると思われます。

長い鎖の蛋白質は2つ以上のドメインにわかれていることが一般的ですが各々のドメインが単独でフォールドする能力、あるいはそれに近い能力をもっていたら(短い鎖の袋小路数) X (ドメイン数)の難しさで大体の形をつくることができます。あとは、複数のドメインが整合性のあるようにドッキングすることを考えればよいのですが、これは袋小路の多いトライアルエンドエラーの過程だと思われます。実際は、ドメインの形成とこのトライアルエンドエラーは同時に進行するので、上に書いたほどはっきり表現できませんが、でも、長さの指数で難しくなってフォールディングが不可能になる、という事態をさけることができると思われます。実際、多くの蛋白質では片方のドメインがほぼ完成しているが、もう片方のドメインの形が崩れていて全体がコンシステントになるまで長い時間がかかる、という過程がフォールディングの途上で観測されています。

同様な論理はドメインの中の小さな構造であるモジュールについても期待できます。Wolynesはこのようなフォールディングの単位になる10~数10残基の局所構造を foldon と呼んでいます。

対称性のある構造はネイティブ構造のエネルギーを下げるのに役立っているかもしれません。結晶のエ

ンタルピーが低いように、安定した構造の設計に有利だからです。ネイティブ構造のエネルギーが低く、エネルギー面のバイアスが大きくてそれに比べて袋小路のエネルギーが小さいように設計できる、つまり、袋小路をいったりきたりするエネルギーが温度エネルギーの程度になるようにデザインできれば、フォールディングが加速されるはずです。

小松崎:

ミリ秒程度のフォールディングでは、粗視化してミリ秒程度の運動に対応する実効的なベイスン（自由エネルギーの谷という意味で）を考えることは可能だと思いますが、そのベイスンを表現する集団座標で運動量が意味のある量として書けるというふうには思えません。蛋白質と水を含む系の調和解析をすれば、もっとも遅い固有振動はピコ秒程度なので、ミリ秒程度の現象に関しては、運動量が顕に現れない、overdamped になっている、と考えたほうがよいと思います。

勿論、僕もそう思います。「要するに、ある集団座標を仮に抽出でき、かつ“粗視化して”、運動量なり慣性なりに意味を持たせようとすると、“ぼやけた”集団運動を取り出すことに相当するはずで（集団的に見えるか否かも自明ではありませんが）、むしろ、原子分子のミクロレベルでは overdamped とみるのが妥当だし、ミクロレベルでどのように動いているかを評価したいならば、そちらのほうがよい」

ということなのだと思います。ミリ秒とまではいかないにしても、どれくらいの長い時間領域まで、ぼやけた集団運動（カオス力学系としての）が折れ畳みダイナミックスを考える上で意味をもってくるのかということキチンと見極めたいといえ、わかってもらえますでしょうか？

シートやヘリックスなどの規則的な2次構造は、例えばある部分の水素結合ができれば立体的規制ができて、その結果、そのまわりも水素結合ができやすくなる、など協同的に構造ができるという仕方袋小路をさける役割を果たしていると思われます。

ベータシートなどの2次構造は、ヘリックスに比べて、水素結合をする部位がひとつずれても、ローカルには安定化するので、ある部分の水素結合ができれば、あとは数珠繋ぎのように、パタパタと安定化する場合もあれば、ひとつずれた間違ったところで水素結合を作った場合は、最初はパタパタと結合を作って安定化するが、そのうち、都合の悪いペアができて、元来た道に戻らないと行けない状況があり得ると思います。分岐の都合のよいエネルギー的バイアスはローカルに決まっているべきだと思うので、ヘリックスはそうかもしれなあと想像しますが、シートは必ずしもまい分岐を与える2次構造ではないような気がします。シートばかりある蛋白質はファネル理論に適合しづらいのであれば、納得しやすいのですが。

対称性のある構造はネイティブ構造のエネルギーを下げるのに役立っているかもしれません

対称性が高いからと言って、ネイティブ構造のエネルギーを下げるのに役立っているかもしれないとは言えないと思います。ケンブリッジ大の David Wales が対称性とエネルギーの関係を色々なクラスターで網羅的に評価した論文 [?] をみると、対称性が高いからといってエネルギー的に安定である傾向にはありませんでした。

ネイティブ構造のエネルギーが低く、エネルギー面のバイアスが大きくてそれに比べて袋小路のエネルギーが小さいように設計できる、つまり、袋小路をいったりきたりするエネルギーが温度エネルギーの程度になるようにデザインできれば、フォールディングが加速されるはずです。

確かにそうデザインされていれば、加速されるはずですが、なぜそうデザインされているのかという問いに対しては、よく分かりませんでした。すみません。

笹井:

「要するに、ある集団座標を仮に抽出でき、かつ“粗視化して”、運動量なり慣性なりに意味を持たせようとする、 “ぼやけた” 集団運動を取り出すことに相当するはずで (集団的に見えるか否かも自明ではありませんが)、むしろ、原子分子のミクロレベルでは overdamped とみるのが妥当だし、ミクロレベルでどのように動いているかを評価したいならば、そちらのほうがよい」ということなのだと思います。ミリ秒とまではいかないにしても、どれくらいの長い時間領域まで、ぼやけた集団運動 (カオス力学系としての) が折れ畳みダイナミクスを考える上で意味をもってくるのかということを見極めたいといえれば、わかってもらえますでしょうか?

もちろん原子分子の精度のことではなく、粗視化された集団運動が overdamped か否か、が重要だとは思いますが (overdamped の集団運動、と表現しても矛盾しないでしょう?)、どのくらいの時間スケールまで力学系としてのカオスの構造が効いているかをきちんと見極めるのが大切だということは全くそのとおりだと思います。

ベータシートなどの 2 次構造は、ヘリックスに比べて、水素結合をする部位がひとつずれても、ローカルには安定化するので、ある部分の水素結合ができれば、あとは数珠繋ぎのように、パタパタと安定化する場合もあれば、ひとつずれた間違ったところで水素結合を作った場合は、最初はパタパタと結合を作って安定化するが、そのうち、都合の悪いペアができて、元来た道に戻らないと行けない状況があり得ると思います。分岐の都合のよいエネルギー的バイアスはローカルに決まっているべきだと思うので、ヘリックスはそうかもしれないかと想像しますが、シートは必ずしもうまい分岐を与える 2 次構造ではないような気がします。シートばかりある蛋白質はファネル理論に適合しづらいのであれば、納得しやすいのですが。

実際に、シートばかりある蛋白質はヘリックスばかりの蛋白質より、ひとけたか、ふたけたフォールディングが遅いのです。しかしシートなら、ずれ方は長さに比例した数のずれ方しかありません。長さの指数で袋小路が増えたりはしないので、規則性がぜんぜんない構造に比べればフォールディングは速いと言えます。長さの指数で重大な袋小路の数が増えればフォールディングは不可能であり、ファネル理論は破綻している、とっていいのですが、そうはなっていません。

対称性が高いからと言って、ネイティブ構造のエネルギーを下げるのに役立っているかもしれないとは言えないと思います。ケンブリッジ大の David Wales が対称性とエネルギーの関係を色々なクラスターで網羅的に評価した論文 [?] をみると、対称性が高いからといってエネルギー的に安定である傾向にはありませんでした。

固体では役立っているのにクラスターでは役立っていない、というのは面白い指摘ですね。表面の効果が効いている、というべきか? 蛋白質では表面はクラスターとは別の意味を持つ (水和している) ので、固体ともクラスターとも違う論理になっているかもしれません。いずれにせよ、私が書いた対称性のくだりは、推測にすぎません。事実としては、違う進化的起源をもっている蛋白質が共通の構造をもっていることは頻繁にあるが、そのときはたいてい対称性の高い構造をとる、ということです。

確かにそうデザインされていれば、加速されるはずですが、なぜそうデザインされているのかという問いに対しては、よく分かりませんでした。すみません。

そのようなデザインにするためには、

(a) 全体がユニークな構造になればうんとエネルギーが下がる。

(b) 部分的にでもユニークな局所構造をとれば、その分だけエネルギーが下がる。

の2点が満足されればよいはずですが。この事情を理想的に表したのが Go モデルですが [19]、実際の蛋白も近似的にこの性質を持っているのではないのでしょうか？

ファネル理論とは、

1. 形のデザインは広い意味でのエネルギーのデザインですが、そうしたデザインで袋小路の数を減らすことができる。それには、2次構造、モジュール、ドメインの論理を使うことができる。(対称性はどうかかわからないけれど)
2. 袋小路ができて、上の (a)、(b) のようになっていけば袋小路の自由エネルギーの深さに比べて全体のエネルギーバイアスが勝つようにデザインできる。
3. 上の (a)、(b) のようになっていけばエントロピー障壁が生じないように、経路を進むにつれて徐々に枝分かれを少なくなるような設計ができる。

と表現できると思います。深い袋小路が長さの指数で増えることが防げれば(増えるのが長さの多項式程度なら)、長い蛋白でも天文学的時間はかけずに、フォールドすることはできる、という具合です。

事実としては、数100残基の長い蛋白のフォールドには、数10残基の短い蛋白より100倍から1000倍程度時間がかかるのだけれど(つまり、秒以上かかる)これを説明するのに形とエネルギー、エントロピーのデザインだけでは不足なので力学的デザインが必要、というふうに推測できるのかどうか、お教えてください。力学的デザインが効いているかもしれない、という可能性はもちろん否定しませんし、力学的な効果の研究の必要性にも賛成します。しかし、ファネル理論では不十分なので力学的デザインが必要、という強い動機付けをすることはまだできない、というのが私の主張です。

小松崎: 僕の説明が足りなかったと思います。ぼやけた集団運動という言葉は、勝手に僕が分かりやすい(かな)と思って作ったもので、“ぼやけた”という言葉は有限サイズリヤブノフ指数の定義ででてくるところの有限サイズの変位(=原子(もしくはサイト)座標の精度がある有限の範囲内でしか評価できない)を意味しようとしたものです。つまり、“協同的な”集団運動を表すであろうある座標のまわりに有限サイズのチューブを想定して、一本一本の軌道の軌道不安定性や overdamp の程度を議論するのではなくて、そのチューブの軌道安定性を評価してやろうというものです。有限サイズリヤブノフ解析が発見したことはミクロには強いカオスであるけれど、マクロには弱いカオスになっている系があるということです。蛋白質の折れ畳みがそうだという、積極的な確証はどこにもありませんが、Garcia らの見つけた異常拡散がもしかしたらそういうダイナミックスをみているのかもしれないと思っています。

ある集団座標を定義して、サイト座標の精度を固定して(一般には、サイト-サイト間の距離よりもはるかに短い距離)、その運動を観るということは、上記でいうところの一本一本の軌道を観ることに対応し

ています。「チューブ」のダイナミクスとして、どのくらいの時間スケールかつ粗視化スケールまで、力学系としてのカオスの構造が効いているかということを見極めようと思っています。

ファネル理論とは。。。と表現できると思います。深い袋小路が長さの指数で増えることが防げれば（増えるのが長さの多項式程度なら）、長い蛋白でも天文学的時間はかけずに、フォールドすることはできる、という具合です。

事実としては、数100残基の長い蛋白のフォールドには、数10残基の短い蛋白より100倍から1000倍程度時間がかかるのだけれど（つまり、秒以上かかる）これを説明するのに形とエネルギー、エントロピーのデザインだけでは不足なので力学的デザインが必要、というふうに推測できるのかどうか、お教えてください。力学的デザインが効いているかもしれない、という可能性はもちろん否定しませんし、力学的な効果の研究の必要性にも賛成します。しかし、ファネル理論では不十分なので力学的デザインが必要、という強い動機付けをすることはまだできない、というのが私の主張です。

”天文学的時間をかけずに、長い蛋白でもフォールドすることはできることを説明するのに、形とエネルギー、エントロピーのデザイン（それがファネル理論で充分表せるか否かは僕には分かりませんが）だけでは不足なので、力学的デザインが必要である”と断定的な表現はしていないつもりです。戸田さんと言われるように力学的にもデザインされているというのは作業仮説のひとつです。そのような視点は、これまでのフォールディングの研究には、Plotkin-Wolynes と Garcia らの研究しか見当たらないし、欠如していたものだと思います。

ちなみに、笹井さんの言われるファネル理論では、遷移状態が天然状態とで2次構造がまったく違う $\beta$ ラクトグロブリンの折れ畳みは完全に説明できるのでしょうか？（念のために、これはエネルギー地形が真に漏斗型をしていると解釈してよいか否かの質問です）”

笹井: 「チューブ」の話はおもしろい話ですね。

”天文学的時間をかけずに、長い蛋白でもフォールドすることはできることを説明するのに、形とエネルギー、エントロピーのデザイン（それがファネル理論で充分表せるか否かは僕には分かりませんが）

どんなふうに表されるかは、誰も知りませんし、表せたとしても、現在のファネル理論と違っていてもいいかもしれません。でも、作業仮説として、力学的デザイン以外が重要だと思う仮説ですね。そういう仮説に望みがあるかどうか？

力学的デザインが必要である”と断定的な表現はしていないつもりです。戸田さんと言われるように力学的にもデザインされているというのは作業仮説のひとつです。

その点では、私とお2人の間に意見の違いはあんまりありません。でも仮説を発展させるためには、どこまでわかっていて、どこからわからないか、という吟味は必要だと思います。

そのような視点は、これまでのフォールディングの研究には、Plotkin-Wolynes と Garcia らの研究しか見当たらないし、欠如していたものだと思います。

Plotkin-Wolynes は力学系の話とは違って、overdamped のケースに限定された話じゃなかったですか？ただ、テクニックとして underdamped で計算しておいて、あとで質量を0にもっていきますが。

ちなみに、笹井さんの言われるファネル理論では、遷移状態が天然状態とで2次構造がまったく違う $\beta$ ラクトグロブリンの折れ畳みは完全に説明できるのでしょうか？(念のために、これはエネルギー地形が真に漏斗型をしていると解釈してよいか否かの質問です) ”

$\beta$ ラクトグロブリンは、エネルギー地形が真に漏斗型をしていない、ということを示す代表例のように思えます。ファネル理論とはなにか、という定義によるのでしょうか、「真に漏斗型」がファネル理論だとすれば、それは現実とは違う。形、エネルギー、エントロピー、(さらに静的な経路という意味で構造間の相関を加えてもよいかもしれない)の設計が本質的、という主張をファネル理論だと定義すれば、現実はその枠内かもしれません(し、そうでないかもしませんが)。

「複雑系」という言葉に対して、「複雑系」なんてナンセンスという人もいたのを思い出します。みんなそれぞれ違う定義で賛成、反対、というわけです。

小松崎:

「チューブ」の話はおもしろい話ですね。

現時点では、「現実的にそのようなチューブの中心を構成する座標をどの様に定義できるのか」、「強力オス系をチューブのダイナミクスとして還元可能である物理的理由・条件はなにか」とかという問いに対する答えはありません。僕は、折れ畳みの反応座標として native contact 数のような “経験的パラメータ” でなく、集団運動を表すある力学変数(今のところ主成分座標、それも1つとは限らない)を考え、その周りのチューブの軌道安定性を折れ畳みの各段階で評価してみようと思っています。そうすれば Garcia が見つけた異常拡散に対するはっきりした力学描像が描けると期待しています。

その点では、私とお2人の間に意見の違いはあんまりありません。でも仮説を発展させるためには、どこまでわかっている、どこからわからないか、という吟味は必要だと思います。

その通りだと思います。折れ畳みの様々な実験・計算結果のなかから、非マルコフ的な弾道的ダイナミクスや力学的デザインの存在を示唆するような痕跡のようなものを探る・吟味することは必要だと思います。1分子計測が更に進展して、現在の時間分解能(科技団の石井さんの発表では0.5ミリ秒ですが、原理的に、実際的に、更に分解能を数桁上げることは簡単だそうです)が向上すれば、それを示唆する具体的な実験結果がでてくることを期待しています(勿論、埋め込み解析のようなものを併用してその力学構造を抽出する解析は必須ですが)。

Plotkin-Wolynes は力学系の話とは違って、overdamped のケースに限定された話じゃなかったですか？ただ、テクニクとして underdamped で計算しておいて、あとで質量を0にもっていきますが。

折れ畳みダイナミクスの非マルコフ性、弾道性、反応座標の問題を議論しているという意味で、です。

ファネル理論とはなにか、という定義によるのでしょうか、「真に漏斗型」がファネル理論だとすれば、それは現実とは違う。形、エネルギー、エントロピー、(さらに静的な経路という意味で構造間の相関を加えてもよいかもしれない)の設計が本質的、という主張をファネル理論だと定義すれば、現実はその枠内かもしれません(し、そうでないかもしませんが)。

でも、protein folder 達は、皆、笹井さんの意味で、「ファネル理論」を使っているのですか？僕はそうではないと思いますが。以下では、便宜上、funnel = 漏斗の意味でのファネル理論を漏斗理論と呼ぶことにします。以前、笹井さんは

ネイティブ構造のエネルギーが低く、エネルギー面のバイアスが大きくてそれに比べて袋小路のエネルギーが小さいように設計できる、つまり、袋小路をいったりきたりするエネルギーが温度エネルギーの程度になるようにデザインできれば、フォールディングが加速されるはずです。

と記述されましたが、これは漏斗理論のことではないのでしょうか？(念のため) また、 $\alpha \rightarrow \beta$  転移を示す  $\beta$  ラクトグロブリンなどが、袋小路に捕まることなく、分岐点領域で、正しい道程のほうだけ選択的にエネルギー的バイアスが存在する(であろう)物理的理由はなんのでしょうか？ また、理由があれば、それは実際に検証した(できる)のでしょうか？

笹井:

僕は、折れ畳みの反応座標として native contact 数のような "経験的パラメータ" でなく、集団運動を表すある力学変数(今のところ主成分座標、それも1つとは限らない)を考え、その周りのチューブの軌道安定性を折れ畳みの各段階で評価してみようと思っています。そうすれば Garcia が見つけた異常拡散に対するはっきりした力学描像が描けると期待しています。

Garcia の話はピコナノ秒の話で、native contact 数はマイクロミリ秒の話なので私は少し混乱しています。

でも、protein folder 達は、皆、笹井さんの意味で、「ファネル理論」を使っているのですか？僕はそうではないと思いますが。

少なくとも、「ファネル理論」を言い出した張本人の Wolynes や Onuchic は実際の蛋白質が「真の漏斗」になっている、とは思ってなくて、構造間の相関(ある構造からこの構造には変形しやすいがあの構造に変形しにくい、という意味での相関)、袋小路がいかに観測されるか、非マルコフ性、ファネル内の構造などについてたくさん論文を書いています。でも、protein folder 達のあいだで用語にコンセンサスがあるかということ、そうではないと思います。

「ネイティブ構造のエネルギーが低く、エネルギー面のバイアスが大きくてそれに比べて袋小路のエネルギーが小さいように設計できる、つまり、袋小路をいったりきたりするエネルギーが温度エネルギーの程度になるようにデザインできれば、フォールディングが加速されるはずです。」と記述されましたが、これは漏斗理論のことではないのでしょうか？

上のようなデザインがあっても「真の漏斗」になる必要はなくて、構造間の相関、袋小路、非マルコフ性が大事で、そういう「真の漏斗」からはずれた機構でフォールドが加速、ないし場合によっては減速されている、ということがあると思います。でも、上のようなデザインがなければ、深い袋小路が指数的に増えてフォールドしないということになる、という主張が漏斗理論だというなら、それはそうだと思います。

私は上のようなデザインが可能ではないか？という予測を試みましたが、そのようなデザインは効果的でないので指数的に増えるミニマムに対処するためには力学的デザインが不可欠になる、というのが戸田さんの予想だったのではなかったかしら？

また、 $\alpha \rightarrow \beta$  転移を示す  $\beta$  ラクトグロブリンなどが、袋小路に捕まることなく、分岐点領域で、正しい道程のほうだけ選択的にエネルギー的バイアスが存在する（であろう）物理的理由は为什么呢？ また、理由があれば、それは実際に検証した（できる）のでしょうか？

$\beta$  ラクトグロブリンではネイティブ構造とは違う中間体に、秒のオーダーでつかまるのですから、きわだって大きい袋小路がある、と表現することもできます。あるいは、ネイティブ構造と中間体の2つの際だったミニマムを持つダブルファネルになっている、と思ってもよい。このとき、ほどけた状態から2つのミニマムのどちらに行くか、確率的に決まるのですが、それは主に構造間のつながりという特徴が効いていると予想します。それでも、指数的に大きな数のミニマムがある、ということ避けるようにデザインされていると思います。このケースでは、中間体を経るか、そうでないか、について「正しい」道程のほうだけ選択的に進むのではなく、複数の進路があって、その平均を実験は見ているにすぎない。ですから、1分子計測ができればその統計が明らかになると思います。

小松崎:

Garciaの話はピコナノ秒の話で、native contact 数はマイクロミリ秒の話なので私は少し混乱しています。

対応する僕の文章は Garcia が見つけた異常拡散に対する解釈を言及しているので、ピコ ナノ秒の話です（より長い時間領域にも粗視化スケールに応じて同様の異常拡散が観測されるかもしれませんが、それは現時点では分からないことです）。native contact 数はマイクロ ミリ秒でしか意味をなさないから、そもそも native contact 数を持ち出すまでもないという事を指摘して下さったのだと思います。その通りだと思います。でも、換言すれば、native contact 数が反応座標としてマイクロ ミリ秒レベルでは意味があるとも受け取れます。Q 値とは native contact をしている残基（サイト）対の数ですから、数は同じでも全く異なる残基（サイト）対が同数形成されている場合を区別していません。また、Q 以外のすべての自由度は早く緩和するため（そもそも Q 以外の自由度も何か分かりませんが）、Q 値を1次元的反応座標と見做してよいという筋書きなのだと思ってしまうのですが、そもそも Q 値が反応座標として妥当か否かは全く非自明なはずなのですが、そうではないのでしょうか？

。。。非マルコフ性、ファネル内の構造などについてたくさん論文を書いています。

非マルコフ性に関する論文は Plotkin-Wolynes くらいしか知らないのですが、ご存じでしたら是非教えてください。

。。。私は上のようなデザインが可能ではないか？という予測を試みましたが、そのようなデザインは効果的でないので指数的に増えるミニマムに対処するためには力学的デザインが不可欠になる、というのが戸田さんの予想だったのではなかったかしら？

深い袋小路が一切ないようなデザインが真に可能であればそうですが、深い袋小路があっても、力学的なデザインによって、深い袋小路への道程を選択的に回避するようなことを自然が進化の過程で獲得していても不思議ではないと思いますし、形のデザインと力学的なデザインが共存していると考えたほうが自然な発想のような気がします（この場合、「力学的」といっても、粗視化されたスケールにおいての、もの

だと推定します)。どちらが主でどちらが副かは、何を問うかに依りますが、天文学的な時間を掛けずに、折れ畳むことを問うのであれば、形のデザインが主だと思います。

$\beta$ ラクトグロブリンではネイティブ構造とは違う中間体に、秒のオーダーでつかまるのですから、きわだって大きい袋小路がある、と表現することもできます。あるいは、ネイティブ構造と中間体の2つの際だったミニマムを持つダブルファネルになっている、と思ってもよい。このとき、ほどけた状態から2つのミニマムのどちらに行くか、確率的に決まるのですが、それは主に構造間のつながりという特徴が効いていると予想します。それでも、指数的に大きな数のミニマムがある、ということ避けるようにデザインされていると思います。

このケースでは、中間体を経るか、そうでないか、について「正しい」道程のほうだけ選択的に進むのではなく、複数の進路があって、その平均を実験は見ているにすぎない。ですから、1分子計測ができればその統計が明らかになると思います。

わかりました。でも、実際に $\beta$ ラクトグロブリンのエネルギー面上、大きな袋小路が"1つしかない"ことを確認した人がいるのでしょうか？

笹井: Q値が妥当かどうかは全くわからないので反応座標を探すのは重要。Plotkin-Wolynesが採用したように、underdampedのモデルは現実的でなくても座標を探すのに役立つかもしれない。という2点は、これまでのメールの中でも書きました。

非マルコフ性に関する論文はPlotkin-Wolynesくらいしか知らないのですが、ご存じでしたら是非教えてください。

私の書き方が不適切だったかもしれませんが、Foldingではなくて酵素反応について蛋白質のゆらぎがいかに効いて非マルコフ的になるか？という話です。でも反応座標を自分自身の構造変化と読めば同じことだと思います。たとえば文献[24, 25]。

わかりました。でも、実際に $\beta$ ラクトグロブリンのエネルギー面上、大きな袋小路が"1つしかない"ことを確認した人がいるのでしょうか？

それはたしかにわかりません。大きな袋小路が複数ある、というのはおもしろい可能性かもしれません。

## 参考文献

- [1] 蛋白質の折れ畳みの動力学的側面の総説としては、M. Karplus, J. Phys. Chem. B **104**, 11 (2000) が挙げられる。
- [2] T.R. Sosnick, L. Mayne and S.W. Englander, Proteins **24**, 413 (1996).
- [3] J.J. Portman, S. Takada and P.G. Wolynes, Phys. Rev. Lett. **81**, 5237 (1998).
- [4] E. Alm and D. Baker, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 11305 (1999).
- [5] C. Clementi, D.A. Jennings and J.N. Onuchic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 5871 (2000).
- [6] A.E. Garcia, R. Blumenfeld, G. Hummer and J. A. Krumhansl, Physica D **107**, 225 (1997).

- [7] A.E. Garcia and G. Hummer, *Proteins* **36**, 175 (1999).
- [8] S.S. Plotkin and P.G. Wolynes, *Phys. Rev. Lett.* **80**,5015 (1998).
- [9] Y. Matsunaga and T. Komatsuzaki, *生物物理および J. Phys. Chem.* prepared for publication.
- [10] A. Xie, A. F. G. van der Meer, and R.H. Austin, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 18102 (2002).
- [11] G. Paladin, M. Serva, and A. Vulpiani, *Phys. Rev. Lett.* **74**(1995)66.
- [12] E. Aurell, G. Boffetta, A. Crisanti, G. Paladin, and A. Vulpiani, *Phys. Rev. Lett.* **77**(1996)1262.
- [13] E. Aurell, G. Boffetta, A. Crisanti, G. Paladin, and A. Vulpiani, *J. Phys. A: Math. Gen.* **30**(1997)1.
- [14] T. Shibata and K. Kaneko, *Physica*, **124D**(1998)177; *Phys. Rev. Lett.* **81**(1998)4116.
- [15] T. Shibata, T. Chawanya and K. Kaneko, *Phys. Rev. Lett.* **82**(1999)4424.
- [16] 「複雑な多谷ポテンシャルエネルギー面上で生起する動力学諸問題 第1回(研究会報告)」物性研究、**76**(1)(2001)57、のなかの柴田氏の論文も参照のこと。
- [17] T.P. Terada, M. Sasai and T. Yomo, 投稿中。
- [18] Vale, R. D. Oosawa, F. *Adv. Biophys.* **26**, 97 (1990).
- [19] S. Takada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11698 (1999).
- [20] N. Go, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 183 (1983).
- [21] 小松崎民樹、「化学反応の「揺らぐ」世界における力学的決定性— 70 年来の「非再交差仮説」の解決—」物性研究 **76**(2001)1.
- [22] T. Komatsuzaki and R.S. Berry, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**(2001)7666; *J. Chem. Phys.* **115**(2001)4105
- [23] T. Komatsuzaki and R. S. Berry, “Chemical Reaction Dynamics: Many-Body Chaos and Regularity” *Adv. Chem. Phys.* (2002) in press.
- [24] Wang and Wolynes, *Phys. Rev. Lett.* , **74**, 4317 (1995).
- [25] Onuchic, Wang, and Wolynes, *Chem. Phys.* **247**, 175 (1999).