



タンパク質フォールディングのダイナミクス - 異常拡散と階層的規則性 -

神戸大学理学部地球惑星科学科 小松崎民樹, 松永康佑

The observed kinetics of protein folding is a consequence of averaging over an ensemble of many activated barrier crossings with multiple time scales. The future of the recent remarkable experimental developments in single molecule spectroscopy holds great promise to reveal the complexity of protein folding dynamics. A few theoretical possible means to address and clarify the dynamical complexity such as abnormal diffusion of a protein are presented.

protein folding dynamics / regularity in thermal transitions / strange kinetics /
stationary-nonstationary transition

1. はじめに

タンパク質の折れたたみは一般に凸凹 (rugged) かつ複雑なエネルギー地形上で生起し、折れたたみのダイナミクスには、さまざまな時間スケールおよび空間スケールの運動が混在している。タンパク質の折れたたみ問題、すなわち、“なぜ天文学的な数の安定状態のなかから効率良く折れたたみ、一義的に天然構造に達しうるのが、また、どのようなアミノ酸配列をもったタンパク質が一義的に折れたたみやすいのか”は生物のみならず、物理、化学、複雑系の観点からも非常に挑戦的な問いである¹⁾³⁾。現在の解釈は、天然に存在するタンパク質は、進化の所産として、天然構造へエネルギー的バイアスがかかったファネル (漏斗) 型地形を獲得していること、ならびに変性状態から天然構造へ至る“滑降 (downhill)”経路が複数存在しうるため (すなわち、“diffuse”な遷移状態)、環境の変化およびアミノ酸配列の突然変異に対しても折れたたみの効率的経路は統計的な意味において頑健に存在しうるというシナリオである。しかしながら、「ダイナミクス」にまで踏み込んで考察すると、その運動論的解釈、すなわち、(あらゆるすべての自由度が) 拡散的か、(ある限定された重要な自由度に関しては) 非拡散的 (ballistic, 弾道的) か、に関してはいまだ十分な議論がなされていない⁴⁾。一般に、変性状態から天然状態へ至る過程は (後述の) 反応座標 Q に沿ったマルコフ的拡散過程であると考え

られている。しかしながら、Plotkin と Wolynes⁵⁾ が議論するように、折れたたみに重要な自由度に関しては、非マルコフ的運動を呈している可能性があり、García と Hummer により観測された水中の酸化シトクロム c の異常拡散⁶⁾ はそのような非マルコフ的な集団運動の存在を示唆している。

近年、小松崎と Berry⁷⁾ は「ポテンシャルエネルギー曲面上での2つベイスン (basin, 麓) をつなぐ鞍部点を交差するダイナミクスにおいて、“ランダムな熱的遷移”にあっても、多くの場合、系は (運動の「方向」の情報を含めた) 規則的な経路をたどっている”こと、および系の遷移過程を記述する反応座標に依存して、ダイナミクスの描像は“確率過程的”な遷移から動力学的な遷移へ変わり得ることを証明した。タンパク質の折れたたみを記述する反応座標として現在よく用いられている指標は Q パラメーターとよばれるものである。これは形成された天然のコンタクト (タンパク質を構成する原子どうしの接触部位) の数の割合であり、数は同じでもまったく異なる天然コンタクトが同数形成されている場合を区別できない。また、Karplus が指摘するように¹⁾、“ Q 以外のすべての自由度が早く緩和するため、 Q を1次元的反応座標と見なしてよい”という前提の下で本来成立するものであり、その前提自体、決して自明ではない。

本稿では、「遷移ダイナミクス全般に対する新たな見方を提供する」従来の基準座標概念を越える1つの枠

Dynamics of Protein Folding - Abnormal Diffusion and Hierarchical Regularity -

Tamiki KOMATSUZAKI and Yasuhiro MATSUNAGA

Department of Earth and Planetary Sciences, Faculty of Science, Kobe University

組みを解説し、ついで、水中の酸化シトクロムcの異常拡散現象を紹介する。最後に、1分子計測技術の時系列データによって浮き彫りにされる新たな動的現象を理解するうえで、今後、その重要性が増すと予想されるカオス時系列解析⁸⁾などを、タンパク質の折れたたみダイナミクスに応用した我々の最近の研究の一端を紹介する。

2. 新しい遷移描像

凸凹なエネルギーランドスケープを伴うタンパク質のように、時定数が拮抗する自由度が多数カップルして存在し、かつ、広い配位空間を調べる必要がある場合、なんらかのコヒーレンスが存在しているとしても「その集団座標をどのように切り出すか」という問題に対する一般的な解答はない。北尾・郷^{9,10)}はruggedなタンパク質系においては、通常の基準座標に加えて、(平均構造近傍の原子座標を観測値とする)主成分解析が非常に有効であることを明らかにした。主成分解析とは、観測値の分散が最大になるように、観測値を線形変換した方向を第1主成分座標とする(第2,第3主成分座標になるほど分散が順次小さくなる)もので、彼らはベイスンの「内」の運動に対する第1主成分座標は単純な拡散運動ではなく、むしろコヒーレントな弾道運動であり得ることを示した。しかしながら、温度が高くなるに従い、基準座標(主成分座標)のような「(独立な)モード」概念は一般に破綻する。特にベイスンの「内」から「外」へすり抜ける(すなわち、広義の意味での化学反応が起こる)状況下では、その遷移は一般にランダムな拡散過程として捉えられている。

2.1 2つのベイスン間の遷移

温度ないしはエネルギーが高くなると、なぜ(独立な)モード概念は破綻するのであろうか? おそらく、大半の人はポテンシャルエネルギー面の非調和性・非線形性が増大するため、と答えるであろう。しかしながら、原点にたち返ると、なぜ非調和性・非線形性が増大するとモード概念は破綻するのであろうか? 実は、この問いはカオスの発生と密接に関わっている。一般に、エネルギーが増大し、系がポテンシャルエネルギー面の非線形性を強く感じるようになると、強い(準)共鳴条件

$$\left| \sum_{k=1}^N n_k \omega_k \right| \approx 0 \quad (1)$$

(ここで、 ω_k はN自由度系のk番目の基準振動数を、 Σ は任意の整数 - $< n_k <$ に対する任意の組み合わせを意味する)を満足する共鳴(カオス)現象が起こり、(線形/非線形結合、および配位/位相空間を問わず)あらゆる任意のモード概念が破綻することが証明され

る。換言するならば、式(1)が満たされない領域ないしは自由度では、コヒーレンスをもった「(独立な)モード」を抽出できる。

通常の基準座標概念が成立しないような高いエネルギー領域においても、配位空間から位相空間へ舞台を変えることによって基準座標の概念をできるだけ保持するように、ポテンシャルの非調和項・非線形項を取り込みながら正準変換を実行し、新しい座標系へ変換することができる。これを正準変換摂動理論とよび、すなわち、この理論は座標、運動量を $\{q_j, p_j\}$ とする任意の停留点近傍の任意の非線形ハミルトニアンH

$$H(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = H_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \varepsilon^n H_n = \frac{1}{2} \sum_j (p_j^2 + \omega_j^2 q_j^2) + \varepsilon \sum_{j,k,l} C_{jkl} q_j q_k q_l + \varepsilon^2 \sum_{j,k,l,m} C_{jklm} q_j q_k q_l q_m + \dots$$

(ここで C_{jkl}, C_{jklm} は q_j, q_k, q_l および q_j, q_k, q_l, q_m の間の結合定数であり、 ε は摂動の強さを表すパラメーターである)に対して次式を満足するような新しい正準変数を導出する。

$$\frac{d^2 \bar{q}_k(\mathbf{p}, \mathbf{q})}{dt^2} + \bar{\omega}_k^2 \bar{q}_k(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = 0 \quad (2)$$

$$\bar{p}_k(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = \frac{\omega_k}{\bar{\omega}_k} \frac{d \bar{q}_k(\mathbf{p}, \mathbf{q})}{dt} \quad (3)$$

ここで $\bar{\omega}_k$ ($= \bar{\omega}_k(\mathbf{p}, \mathbf{q})$) は正準変換後の \bar{q}_k に付随する振動数であり、 (\mathbf{p}, \mathbf{q}) の関数であるが、作用 $\frac{1}{2\pi} \oint \bar{p}_k d\bar{q}_k$ が近似的に保存される領域ではほぼ一定の値をとる。換言すれば、できるだけ各々の作用が保存されるように正準変換を繰り返す理論と言える。この新しい位相空間上の“基準座標”は従来の基準座標が成り立たない高いエネルギー領域においても成立するが、活性化障壁ほどエネルギーが高くなると、この“基準座標”描像も通常は破綻する。しかしながら、ベイスンとベイスンを繋ぐ鞍部領域、すなわち、虚の振動数 ω_i を伴う“反応性”座標を1つ含む領域では、いかなる組み合わせを考えても $n_1 = 0$ では $|\sum_{k=1}^N n_k \omega_k| \geq |n_1 \omega_i| = 0$ であることがわかる⁷⁾。このことから、鞍部領域において、ベイスンとベイスンを繋ぐ軌道の階層的規則性に関する階層的エネルギー帯が存在し、広いエネルギー領域にわたって、元の (\mathbf{p}, \mathbf{q}) 空間においてランダムに振る舞う遷移過程は、(モード概念が破綻する)強いカオス系においても、系によらず、虚の振動数をもつ「独立モード \bar{q}_i 」に

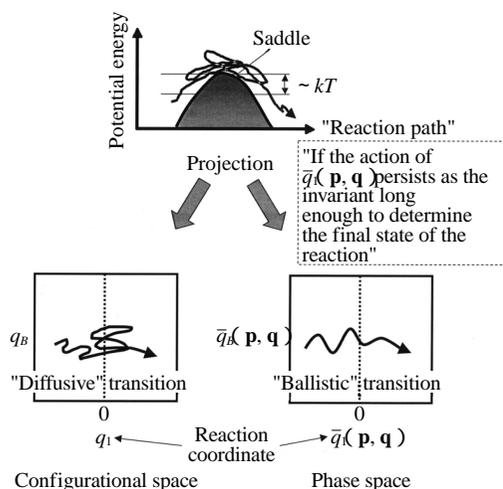


Fig.1 A schematic picture of a "thermal" recrossing trajectory projected onto the configurational, and phase space planes. Here, q_B and $\bar{q}_B(\mathbf{p}, \mathbf{q})$ represent an arbitrary nonreactive coordinate (both the spaces, respectively).

沿って進行していることを証明することができる (Fig.1 参照)。これは、鞍部領域の「前」と「後」を繋ぐダイナミクスの間には、高エネルギー、高温下であっても、動的相関が反応方向に対して頑健に存在することを意味する。さらには、観測者の視点を座標空間から位相空間へ移すことによって、ダイナミクスの描像は劇的に変わり得ること、また、遷移は“熱”運動のなかに潜む規則的経路をたどっているため、溶媒を反応進行を阻害する“分子摩擦”と見なす単純な遷移描像を問い直す必要があることを示唆している。

2.2 多谷遷移を伴うタンパク質の複雑な運動

タンパク質に話を戻すことにしよう。タンパク質ダイナミクスの描像が、観測する視点によって大きく変わり得ることを端的に示しているのが、水中の酸化シトクロムcで観測された strange kinetics¹¹⁾として知られる異常拡散現象であろう。García と Hummer⁶⁾は温度300 ~ 500 K, 1.5 ナノ秒 (ns) 以上の水中の酸化シトクロムcの分子動力学 (MD) シミュレーション (全原子シミュレーション: 溶媒 = 5760個の水分子 + 31個のイオン) を敢行し、タンパク質部位の構造揺らぎをよく表現する集団座標 P_i (主成分座標に相当) を抽出し、その平均自乗変位の自己相関関数 $\eta_i(t) = \langle [P_i(t) - P_i(0)]^2 \rangle$ を各温度で見積もった。天然状態が安定に存在する300 Kでの第1, 第2主成分の $\eta_1(t)$ と $\eta_2(t)$ を Fig.2 に示す。

$\eta_i(t) \sim t^\beta$ ($\beta \approx 1$) であれば、観測量 $P_i(t)$ がマルコフ過程を意味するブラウン運動に従うことを意味するが、これらの集団座標は明らかにブラウン運動ではな

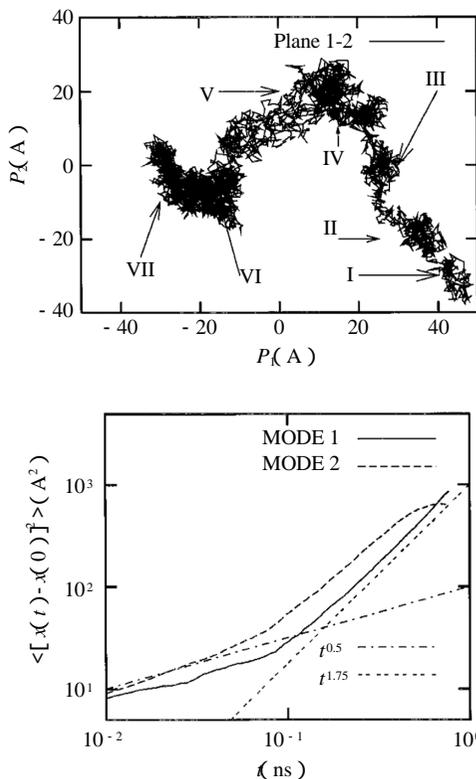


Fig.2 The projections of the MD trajectory along P_1 - P_2 at 300 K (upper) and the log-log plot of $\eta_1(t)$ vs t and $\eta_2(t)$ vs t (lower). A and x denote angstrom, and P_1 and P_2 , respectively. (Fig.1 in their article⁶⁾, Copyright © (1999 and John Wiley & Sons). Reprinted by permission of Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.)

い。すなわち、100 ピコ秒 (ps) 以下では $\beta \approx 0.5$ であり、(小さな) ベイスンの「内」の大振幅集団運動は通常のブラウン運動よりも抑制された“拡散” (sub diffusion) であること；一方、100 ps 以上の時間領域では $\beta \approx 1.75$ であり、大振幅集団運動は通常のブラウン運動よりも促進された協奏的“拡散” (super diffusion) であることを示している。これは複数の (小さな) ベイスンを越えていく多谷遷移の過程が非ブラウン的な弾道運動であることを反映しているものと考えられる。彼らは、100ps 以上において観測された非ブラウン的な弾道運動が、より大きなベイスン間の多谷遷移を伴う高い温度360 Kおよび430 Kにおいても同様に観測されること；nsの時間領域で unfolding が観測されはじめる500 K以上になると、これらの集団座標においてもブラウン運動 ($\beta \approx 1$) に漸近することを明らかにした。

折れたたみの時間スケールは、García らが異常拡散を観測した時間スケールよりもはるかに長く、タンバ

ク質はより莫大な数の鞍点と谷を乗り越えながら変性状態から天然状態へ至る。そのような折れたたみダイナミクスに対する数理モデルからのアプローチとして、Plotkin と Wolynes⁵⁾の研究が挙げられる。彼らは Q を反応座標とする overdamped な一般化ランジュバンモデルと変分的遷移状態理論を用いて、配位空間上のダイナミクスにおける非マルコフ性と折れたたみ速度の関係を解析した。その結果、ある領域 ($T_f/T_g \approx 1.6$: T_f および T_g は、それぞれ、折れたたみ温度、ガラス転移温度)において、非マルコフ的なダイナミクスが折れたたみを顕著に促進する可能性があること、さらには、(天然状態と変性状態を二分する)折れたたみの最適な分割面を抽出する上で、 Q 以外に熱浴自由度を反応座標に繰り込むことが本質的に重要であることを指摘した。

3. フォールディングのダイナミクスに関する一考察

我々は (β -barrel 型の天然構造に折れたたみ)46個、3種のピーズから構成される Thirumalai らの off-lattice モデル (以下 BLN[†] モデルとよぶ) と β -barrel 構造にエネルギー的バイアスを与え、フラストレーションを最小にした Gō-like BLN モデル¹²⁾の両者の折れたたみダイナミクスを解析した。Wales ら¹³⁾は極小エネルギー構造とそれらを繋ぐ鞍点を網羅的に調べ、disconnectivity graph という手法を用いて、BLN モデルのエネルギー地形を可視化し、Nymeyer ら¹²⁾が指摘するように、このモデルは二状態的の転移を与える理想的なファネル型地形ではなく、むしろガラス状態になりやすい、より rugged な地形を有していることを明らかにした。それゆえ、BLN (bad folder) と Gō-like モデル (good folder) におけるダイナミクスの相違点を時系列解析を通じて浮彫りにすることは「エネルギー地形の違いがダイナミクスにどのような影響を与えるか」、さらには、「1分子計測により得られる(であろう)時系列からそのタンパク質のエネルギー地形が推測可能であるか」を解明する手がかりを与えるものと期待される。

我々はさまざまな温度における等温 MD シミュレーション¹⁴⁾を実行し、ポテンシャルエネルギー揺らぎ $V(t)$ および主成分座標 P から BLN および Gō-like モデルのダイナミクスを解析した。Fig.3 に両モデルの各温度におけるポテンシャルエネルギーのアラン分散 $\sigma_A^2(N)$

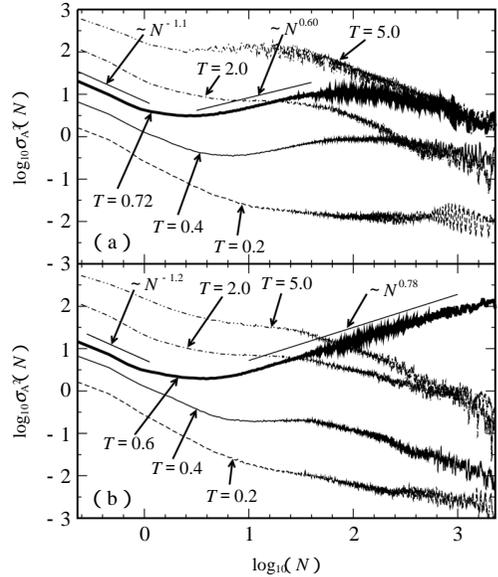


Fig.3 The Allan variance of potential energy fluctuations : (a)BLN model, (b) Gō-like model. The transition temperature are 0.72 for BLN model and 0.6 for Gō-like model, respectively.

を示す。アラン分散

$$\sigma_A^2(N) = \frac{1}{2} \left\langle \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s(i) - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s(i+N) \right)^2 \right\rangle \quad (4)$$

は、時系列 $s(t)$ の非正常性を評価する指標であり、 $s(t)$ が定常である場合には大数の法則に従うスケール則：

$$\sigma_A^2(N) \sim O(N^{-\gamma}) \quad (\gamma: \text{正の定数}) \quad (5)$$

を満足するが、非定常の場合には一般に $\gamma < 0$ を与える (ここで、 N は離散化された時間を表している) BLN および Gō-like モデルともに、転移温度付近で顕著な非定常領域が現れるが、転移温度から離れるに従い、非定常性が消失することがわかる。また両モデルとも、転移温度において、定常域 ($\gamma > 0$) 非定常域 ($\gamma < 0$) への遷移が $N \sim 10^{0.4}$ (10^3 MD ステップに相当) において観測される。BLN モデルでは、非定常域が現れる時間スケールからさらに時間 $N \sim 10^2$ (10^5 MD ステップに相当) になると、再び定常域が出現するが、Gō-like モデルでは非定常性が強く、少なくとも $N \sim 10^{3.4}$ まで「非定常域 定常域の遷移」は観測されない (この強い非定常性は個々のサンプルにほとんどよらず、(BLN モデルのように) 非定常域の後に定常域が再現される軌道は、全サンプル数のわずか数%である)。転移温度において、 $N < 10^{0.4}$ の短時間領域ではタンパク質は (無数の凸凹な起伏を含む) 大きなベイスンの「内」に留まるため、

† これはアミノ酸残基を hydrophobic, hydrophilic, Neutral という3種類の性質に分類したことから名付けられた。

“局所的に”定常的な振る舞いをするが、時間が長くなるにつれて、タンパク質は大きなベイスン間を遷移するようになり、非定常的なゆっくりした大きな揺らぎが生じる。

$V(t)$ のパワースペクトル $S(f)$

$$S(f) = \frac{1}{T} \left| \int_0^T dt e^{2\pi ift} V(t) \right|^2 \quad (6)$$

においては、高野ら¹⁵⁾が polypeptide の helix-coil 転移において観測したように、両モデルとも“白色”ノイズから $1/f^\alpha$ ノイズ (BLN : $\alpha = 1.4$, Gō-like : $\alpha = 1.5$) への顕著な転移が転移温度付近で観測されるが、“白色”ノイズ ($\alpha \sim 0.4 - 0.5$) $1/f^\alpha$ ($\alpha \sim 1.4 - 1.5$) の転移は、Gō-like モデルのほうが (温度の関数として) より先鋭に観測される。overdamped ランジウバダイナミクスの場合、転移温度付近では、微弱な非定常性 $\gamma \sim -0.4$ (BLN) ~ -0.2 (Gō-like) (定常域では $\gamma \sim 0.2$ (BLN) ~ 0.15 (Gō-like)) しか観測されず、パワースペクトル $S(f)$ においても、 $T = 0.2 - 5.0$ において両モデルとも $\alpha \sim 0.5 - 0.7$ であり、顕著な“白色”ノイズ $1/f$ 転移は観測されない。このことから、転移温度において観測された $1/f$ 揺らぎは、間欠的な非定常ダイナミクスに起因するものと考えられる。

フラストレーションが「より小さい」ファネル型エネルギー地形をもつタンパク質はその転移温度において「より広範囲な」時間領域にわたって「より強い」非定常性を示し、“白色”ノイズ $1/f^\alpha$ ノイズへの「より先鋭な」転移を伴う。このことは、ファネル型エネルギー地形をもつタンパク質は運動の記憶をより保持しやすい傾向があることを意味している。紙面の都合上、詳細は原著論文¹⁶⁾に委ねるが、我々は主成分空間に対して、埋め込み論⁹⁾とよばれるカオス時系列解析を適用して、各温度領域に対して、その主成分に沿った運動の次元性 (運動がランダムであればあるほど、系を構成する全自由度数に原理上漸近する) も解析した。その結果、全主成分時系列の 70 ~ 80% はわずか 100 MD ステップ程度で、100 ステップ前の「位置の記憶」を失い“ランダムな”時系列と化すが、アラン分散およびパワースペクトル解析同様、転移温度では揺らぎの大きい数十成分の埋め込み次元が、ほかの温度領域のそれに比べて顕著に小さいことが判明した。これらの結果は、折れたたみダイナミクスの非マルコフ性は、転移温度において顕著に現れ、大きな揺らぎを伴う低次元的な集団運動として捉えられる可能性を示唆している。

今後、タンパク質の折れたたみダイナミクスに関する理論的研究は、分子固有のダイナミクスの観測を

可能とする 1 分子計測技術の進歩に呼応する形で、今後ますます盛んになり、タンパク質の折れたたみ、および機能に関する新たな動的描像を呈示することが期待される。既成の基準座標概念を越えた (運動「方向」の情報を通り越した) 新しいモード概念ならびにカオス時系列解析は、折れたたみダイナミクスの規則性に関する階層的なメカニズムの実験的検証、「揺らぐ」環境下での「機能」発現に関する動的理解を行う上で、その重要性は今後増すものと期待される。

最後に、共同研究者であるシカゴ大学化学科の R. S. Berry, K. S. Kostov ならびに日々有益な議論をしてくださる笹井理生、木寺昭紀、北尾彰朗および高田彰二の各氏に深く感謝します。なお、本稿の一部は基盤研究 C、特定領域 A「分子物理化学」、および特定領域 C「ゲノム情報科学」から財政支援を受けており併せて感謝します。

文 献

- 1) Karplus, M. (2000) *J. Phys. Chem. B* **104**, 11-27.
- 2) 高田彰二 (2000) 生物物理 **40**, 20-24.
- 3) 永山國昭 (2001) 生物物理 **41**, 196-200.
- 4) 笹井理生, 小松崎民樹, 戸田幹人 (2002) 物性研究 **78**, 475-509.
- 5) Plotkin, S. S. and Wolynes, P. G. (1998) *Phys. Rev. Lett.* **80**, 5015-5018.
- 6) García, A. E. and Hummer, G. (1999) *Proteins* **36**, 175-191.
- 7) Komatsuzaki, T. and Berry, R. S. (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**, 7666-7671; (2002) *Adv. Chem. Phys.* **123** 79-152; 小松崎民樹 (2001) 物性研究 **76**, 1-44.
- 8) Abarbanel, H. D.-I. (1995) *Analysis of Observed Chaotic Data*, Springer-Verlag, New York; 池口 徹, 山田泰司, 小室元政 (2000) 合原一幸編『カオス時系列解析の基礎と応用』産業図書.
- 9) Kitao, A. and Gō, N. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 164-169; 北尾彰朗 (1993) 物性研究 **60**, 239-268.
- 10) Becker, O. M., MacKerell, Jr., A. D., Roux, B. and Watanabe, M. (Eds.) (2001) *Computational Biochemistry and Biophysics*, Marcel Dekker, Ner York.
- 11) Shlesinger, M. F., Zaslavsky, G. M. and Klafter, J. (1993) *Nature* **363**, 31-37.
- 12) Nymeyer, H., García, A. E. and Onuchic, J. N. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5921-5928.
- 13) Wales, D. J., Doye, J. P. K., Miller, M. A., Mortenson, P. N. and Walsh, T. R. (2000) *Adv. Chem. Phys.* **115**, 1-111.
- 14) Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. and Haak, J. R. (1984) *J. Chem. Phys.* **81**, 3684-3690.
- 15) Takano, M., Takahashi, T. and Nagayama, K. (1998) *Phys. Rev. Lett.* **80**, 5691-5694.
- 16) Matsunaga, Y., Kostov, K. S. and Komatsuzaki, T. (2002) *J. Phys. Chem.* in press.



小松崎民樹

小松崎民樹 (こまつぎき たみき)

神戸大学理学部地球惑星科学科 助教授

1994年総合研究大学院大学数物科学研究科(分子研理論系第一)修了. 理学博士. 同年基礎化学研究所(現京都大学福井謙一研究センター)研究員, 日本学術振興会特別研究員, シカゴ大学化学科Research Associateを経て, 99年7月より現職.

研究内容: 既存の枠組みで記述できない(特に化学・生物における)ダイナミクス全般に興味があり, 現在, 状態変化の規則性, 「揺らぎ」と「機能」の関係, 個と全体の自律的境界生成という観点から, 複雑な生体ダイナミクスを理解したいと考えている.

連絡先: 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

E-mail: tamiki@kobe-u.ac.jp

松永康佑 (まつなが やすひろ)

神戸大学大学院自然科学研究科地球惑星科学専攻 博士課程前期2年

連絡先: 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

E-mail: yasu@kobe-u.ac.jp