

第6章

アミノ酸置換によって熱力学量はどのように変化するのだろうか？

<要旨>

2個の天然構造と、それぞれ2個のアミノ酸配列をもつ3次元格子タンパク質のそれぞれで、野生型の各アミノ酸残基を他の19種類のアミノ酸残基に置換する（変異体と呼ぶ）ことによって生じる、2つの熱力学量の変化、フォールディングの転移温度の変化とコンフォメーション・エネルギーの変化とが、強い相関をもっていることを示している。

さらに、アミノ酸配列上の各部位は、アミノ酸置換に対してある種の感受性（susceptibility）をもっているとすると、各部位の感受率は天然構造によって基本的に決まっていることも示している。

また、野生型と変異体に対する、フォールディングの度合いをみるための秩序度（反応座標）に対する自由エネルギー関数の差から、天然状態にあるアミノ酸数の割合を、秩序度の関数として、各アミノ酸残基毎に求める方法を示している。この量は、ある秩序度において、各アミノ酸残基が天然状態と同じ構造を形成しているかどうかを表す量とみなせる。

具体的に、3次元格子タンパク質に対して、各アミノ酸残基毎にこの量を計算して、反応座標の各点で、各々のアミノ酸残基がどの程度天然状態であるかを求め、フォールディングの統計的道筋を議論している。



変異体タンパク質とは？

生物の進化において、DNA の塩基配列がある確率で変化（変異）することは避けがたいだろう。そして、その結果として、タンパク質のアミノ酸配列も変化する。生物の生存にとって有利な変化を獲得することが、生物の進化における基本的な出来事であろう。しかしそれだけではなく、自然選択に有利でも不利でもない中立的な変化も起こることが知られており、それがアミノ酸配列の多様化を引き起こしている。

一方、物理学的観点からすれば、1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換するという変化は、タンパク質に加えられた一種の“摂動”とみなすことができる。この“摂動”による変化を詳細に調べることによって、ある系の本質を理解する手助けになるだろう。

もとの3次元格子タンパク質（野生型タンパク質と呼ぶ）の、ある部位のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換して、新たな3次元格子タンパク質（これを変異体タンパク質と呼ぶ）を作成する。このとき、3次元格子タンパク質のフォールディングに関する熱力学量がどのように変化するかを調べてみることは大変興味深い。

しかし、野生型タンパク質の、ある部位のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換して作成した変異体タンパク質に対して、その都度コンピュータ・シミュレーションを実行して、フォールディングに対する熱力学量を求めて、その量がどのように変化するか、つまり摂動に対する応答をチェックすることは、膨大な計算時間が必要となり、現実的ではない。

それ故、すべての変異体タンパク質のフォールディングに対する熱力学量を、統計力学モデルである「A-W_NILS モデル」を用いて敏速に計算しよう。特に、2つの熱力学量の変化である、「エンタルピーの変化」と「転移温度の変化」を計算する。ただし、ある部位を他のアミノ酸残基で置換した新たなタンパク質（変異体タンパク質）が、確実に天然構造へとフォールドするかどうかのチェックまでは踏み込まず、ある部位を他のアミノ酸残基で置換した新たなタンパク質（変異体タンパク質）は、もとの野生型のタンパク質の小さな摂動とみなして、つまり、変異体タンパク質も野生型タンパク質と同じ天然構造へとフォールドするとみなして、アミノ酸置換によって引き起こされる熱力学量の変化を、とりあえず定性的な結果として眺めてみることにしよう。

<文献> H. Wako and H. Abe, Single Amino Acid Substitutions in Lattice Proteins Using Statistical Mechanical Model for Protein Folding, J. Phys. Soc. Jpn. Vol.76, pp. 104801-1, 10480-2, 2007.

<文献> 安部 晴男, 輪湖 博, “タンパク質フォールディングの統計熱力学, III. アミノ酸置換による熱力学量の変化とフォールディング過程”, 西日本工業大学紀要, 第38巻, pp. 93-101, 2008.



“First Sunlight”



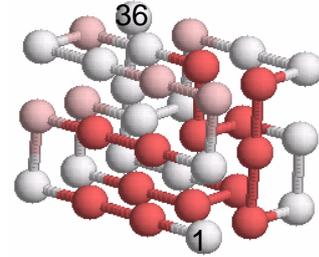
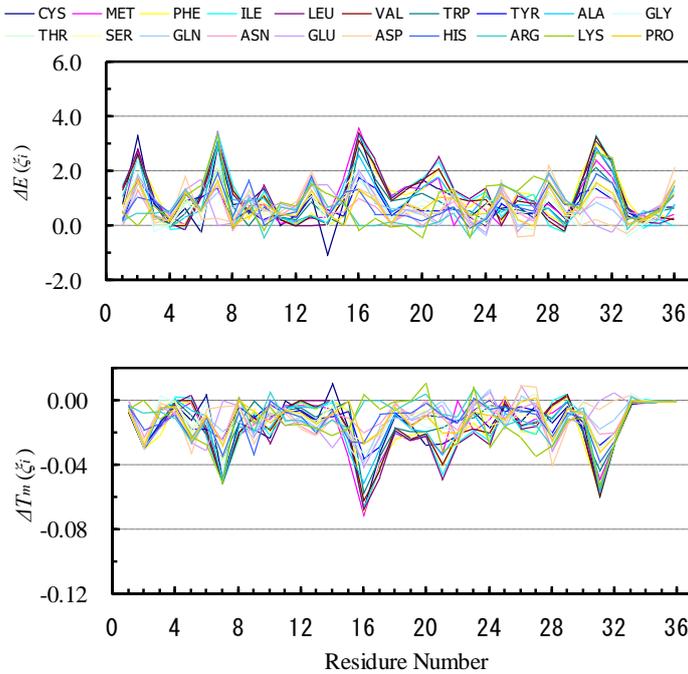
アミノ酸置換による、エンタルピー変化と転移温度変化

下図の左側の上段は、タンパク質 a1, a2, b1, b2 に対して、それぞれの部位で、そのアミノ酸残基を他の “19 種類のアミノ酸残基に置換” したときの天然構造全体のエンタルピーの変化 (ΔE) を表し、下段は、その時の転移温度の変化 ΔT_m を示している (T_m ; 転移温度)。

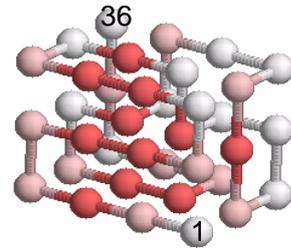
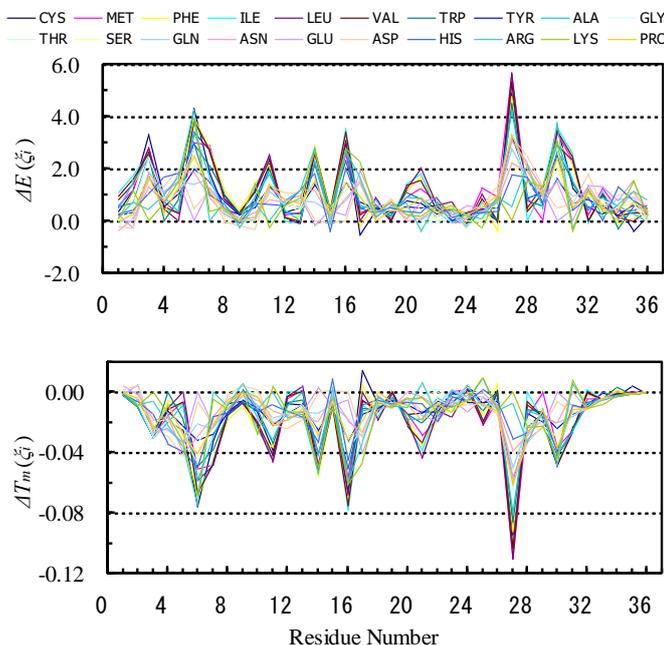
右側の立体構造の図は、天然立体構造上で、変化が大きいアミノ酸残基に色をつけたものである。濃い赤色程、変化が大であることを示している。

エンタルピーの変化 ΔE , 及び、転移温度の変化 ΔT_m に対する、アミノ酸残基部位の依存性をみてみよう。タンパク質 a1 と a2 では、かなり異なっている。

(a1)



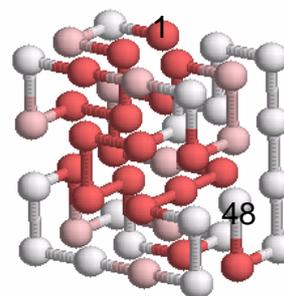
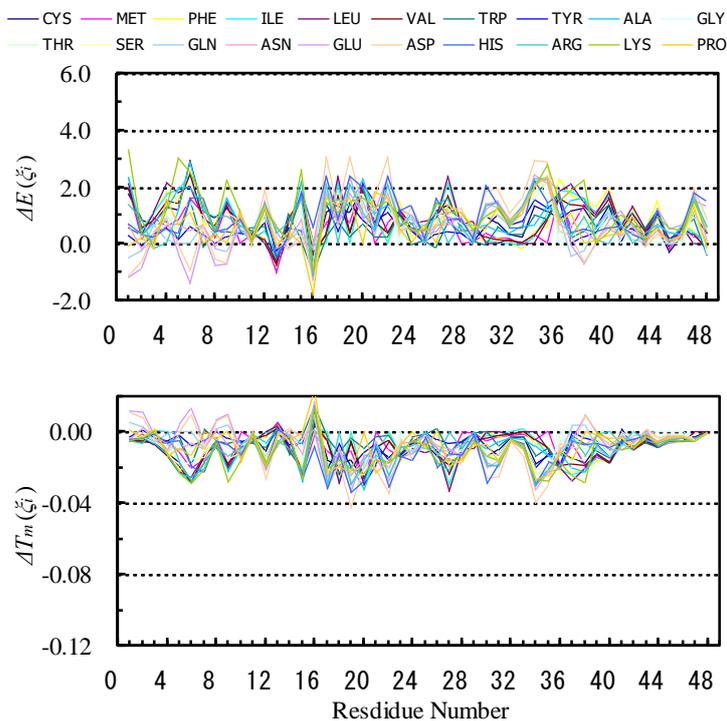
(a2)



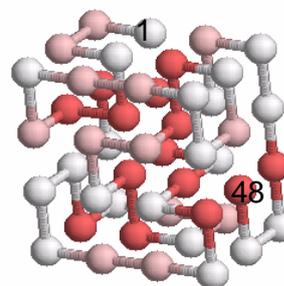
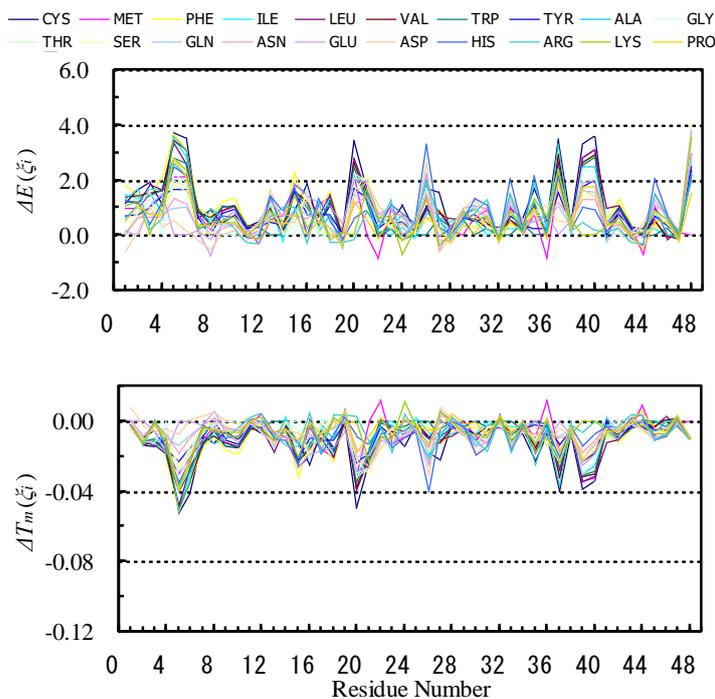
第6章 アミノ酸置換によって熱力学量はどのように変化するのだろうか？

タンパク質 *b1* と *b2* も、かなり異なっている。これは、タンパク質 *a1* と *a2*, *b1* と *b2* は、同じ天然構造であるが、それぞれのアミノ酸配列が異なるので、同じ部位における相互作用の値が異なることになり、その結果、エンタルピーの変化 ΔE , 及び、転移温度の変化 ΔT_m も異なっていると考えられる。

(b1)



(b2)





エントロピー変化と転移温度変化の相関

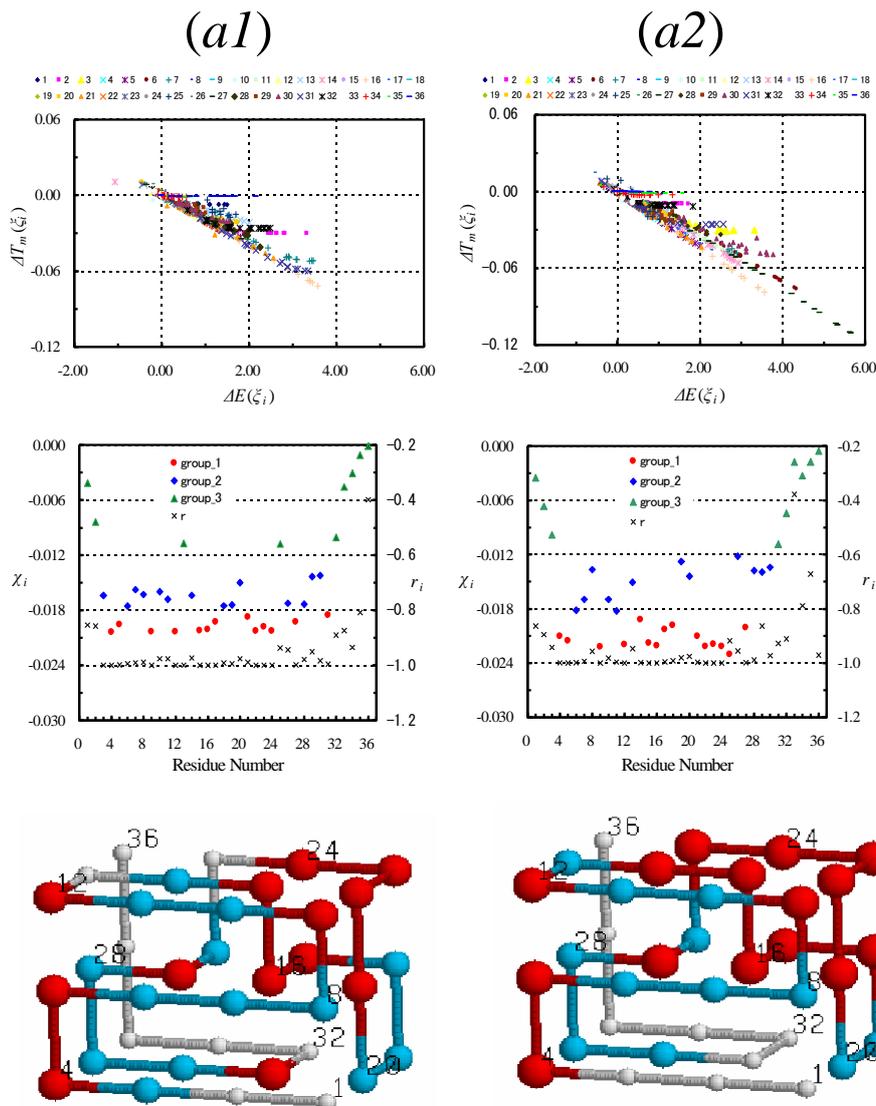
下図上段は、タンパク質 $a1$, $a2$, $b1$, $b2$ に対する ΔE と ΔT_m の相関を表している。

多くの部位で ΔT_m と ΔE は相関している。つまり、転移温度の変化は、基本的に天然構造のエントロピー（内部エネルギー）変化とよい相関がある。しかも、タンパク質 $a1$ と $a2$ の、両方の、ほとんどの部位でよく一致していることがわかる。

ただし、両末端など一部の部位では、 ΔT_m と ΔE は比例せず ΔE がある程度以上大きくなると、 ΔT_m が一定値となる傾向がみられる。

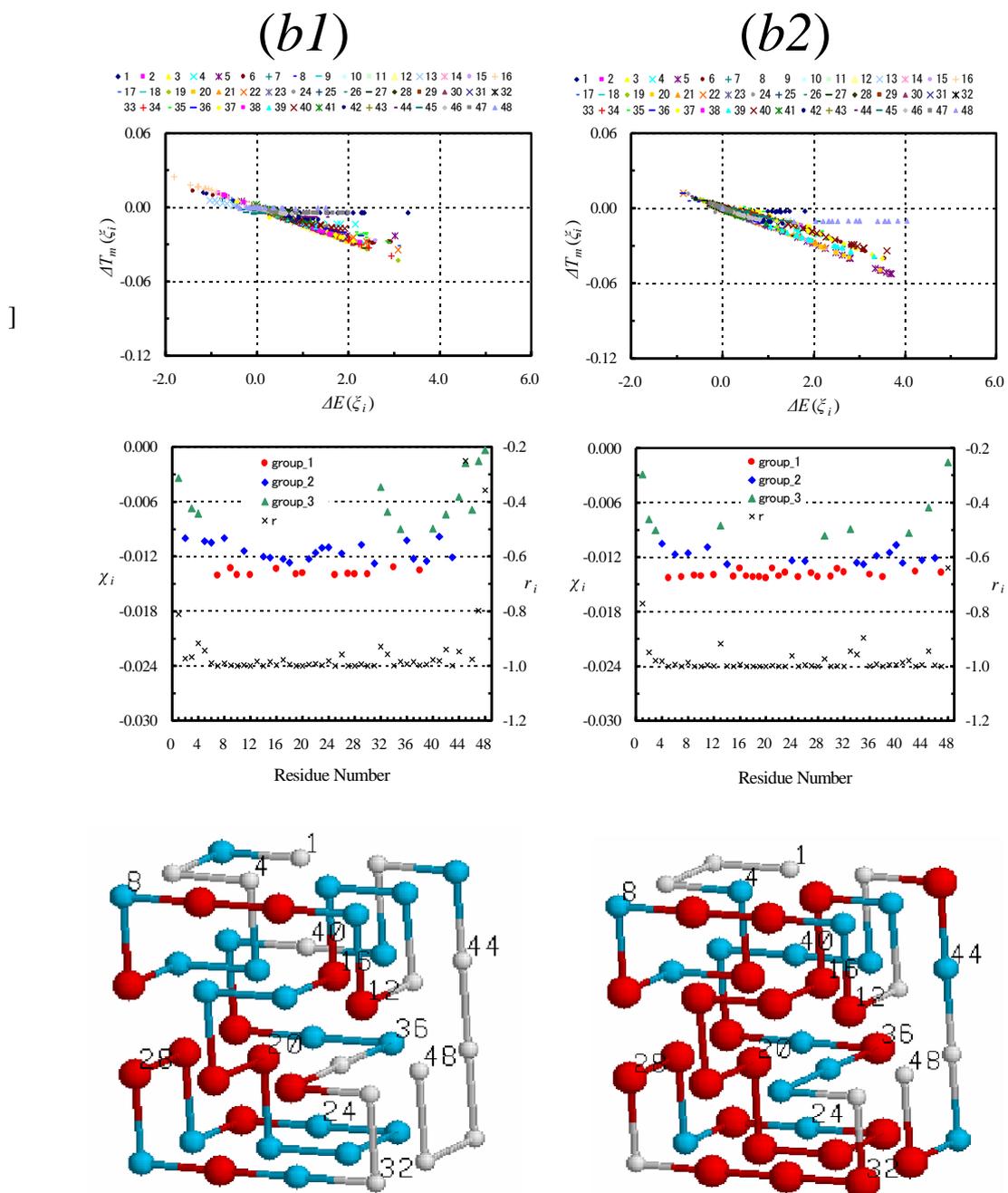
アミノ酸残基部位毎の ΔE と ΔT_m との回帰係数 r をプロットしたのが、図の中段であるが、 ΔT_m が ΔE に比例する部位は、その傾きから、アミノ酸残基を3つのグループに分類することができる。

アミノ酸残基部位を上のに3つに分類し、それを実際の立体構造上に表示してみると（図の下段）、タンパク質 $a1$ と $a2$ は、きわめてよく似ていて、しかもドメインを形成していることがわかる。明らかに両者で異なる部位は、3, 13, 14, 18, 25, 31 の6個の残基のみである。



第6章 アミノ酸置換によって熱力学量はどのように変化するのだろうか？

一方、タンパク質 *b1* と *b2* の場合、グループ1とグループ2では、48個のアミノ酸残の内20個の残基が異なるグループに属していることがわかる。しかしながら、グループ1とグループ2のグループ分けはかなり微妙で、 ΔE と ΔT_m との回帰係数 r の分類基準を少し変更して、グループ2の15, 17, 18, 21, 31をグループ1に分類してみると、タンパク質 *b1* と *b2* のグループ分けもかなり一致してくるのがわかる。



これらの結果から次のことが推察できる：

『アミノ酸配列上の各部位は、アミノ酸置換に対してある種の感受性（susceptibility）をもっているとする、各部位の感受率は天然構造によって基本的に決まっていることを示している。』

ただし、同じ天然構造をもっている、アミノ酸配列の違いによって、その感受率が異なる部位もある。

現実のタンパク質でも、アミノ酸置換による疎水性の変化（ ΔE に対応）と安定性の変化（ ΔT_m に対応）によい相関があるという報告もある一方、そうした相関を見出すことができなかつた例も報告されており、一般に、アミノ酸置換による安定性の変化を、正確に予測することはかなり困難であるというのが現状である。

フォールディング過程において、各アミノ酸残基は、どの程度、天然状態を形成しているのだろうか？

タンパク質が取り得るすべてのコンフォメーションを天然状態にある残基数 n で分類し、温度 T での、天然状態にある残基数 n に対する自由エネルギー $F(n, T)$ を考える。

ここで、天然状態にあるアミノ酸残基数の割合 $\eta (= n / (N - 3))$, $0 \leq \eta \leq 1$ を導入する。 η は、フォールディングの度合いを見るためのある種の秩序変数（反応座標）とみなすことができる。

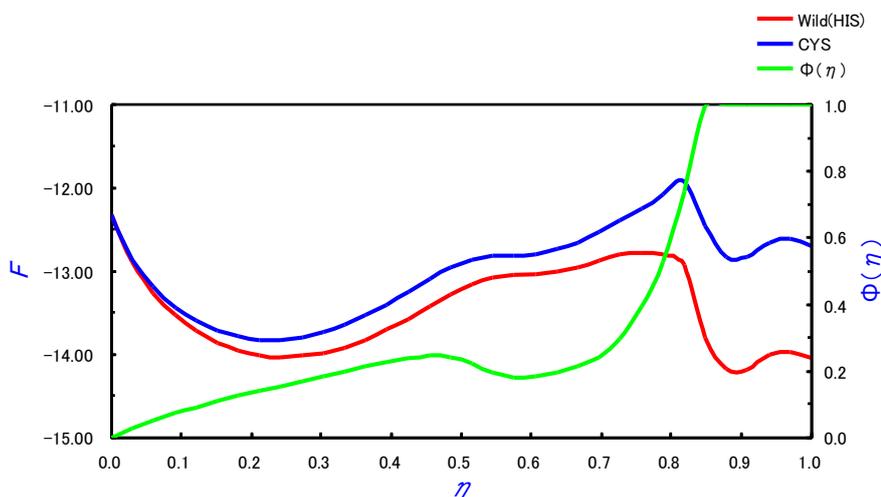
いま、野生型タンパク質と、その変異体タンパク質の i 番目のアミノ酸残基のタイプを、それぞれ、 w_i , ξ_i とするとき、次のような量を導入する；

$$\phi(\eta, \xi_i) = \frac{F(\eta, \xi_i) - F(\eta, w_i)}{F(1, \xi_i) - F(1, w_i)}$$

ここで、上式の分子の項、 $F(\eta, \xi_i) - F(\eta, w_i)$ は、 i 番目のアミノ酸残基のタイプを w_i （野生型の残基）から、 ξ_i （変異体の残基）へ置換したときの、与えられた η における野生型と変異体の自由エネルギーの差を表している。上式の分母の項、 $F(1, \xi_i) - F(1, w_i)$ は、 i 番目のアミノ酸残基のタイプを野生型 w_i から、変異型 ξ_i へ置換したときの、 $\eta = 1$ 、つまり天然状態における野生型と変異型の自由エネルギーの差を表している。

下図は、例として、秩序変数 η に対する次のような量の曲線を描いている；

- 野生型で、あるアミノ酸残基がヒスチジン（His）のときの自由エネルギー曲線（赤色）
- このアミノ酸残基を、システイン（Cys）に置換した変異型の自由エネルギー曲線（青色）
- 上の置換による自由エネルギー曲線の変化から求められる ϕ 値曲線（緑色）



$\phi(\eta, \xi)$ 値を使えば遷移状態ばかりでなく、反応座標 η の任意の値で、各アミノ酸残基が部分的に天然状態と同じ構造を形成しているかどうかを見積もることが可能であり、タンパク質のフォールディング過程全般を追跡できる量とみなすことができる。

$\phi(\eta, \xi)$ が 1 に近ければ近いほど、残基 i 周辺は、反応座標 η で、部分的に天然状態に近いと考えられ、 $\phi(\eta, \xi)$ が 0 に近ければ近いほど、反応座標 η で、部分的に天然状態とはほど遠い状況にあることになる。

この ϕ 値は、Fersht らによって導入された、遷移状態での各アミノ酸残基が天然状態かどうかを推定する量、いわゆる、“ Φ 値”に対応する量を拡張したものになっている。この“ Φ 値”は、タンパク質のフォールディング過程を検証するのに重要な量である。第8章で、 Φ 値の定義と3次元格子タンパク質に対する Φ 値の結果を示している。実際のタンパク質に対する Φ 値の結果は、第9章～第11章で取り上げている。

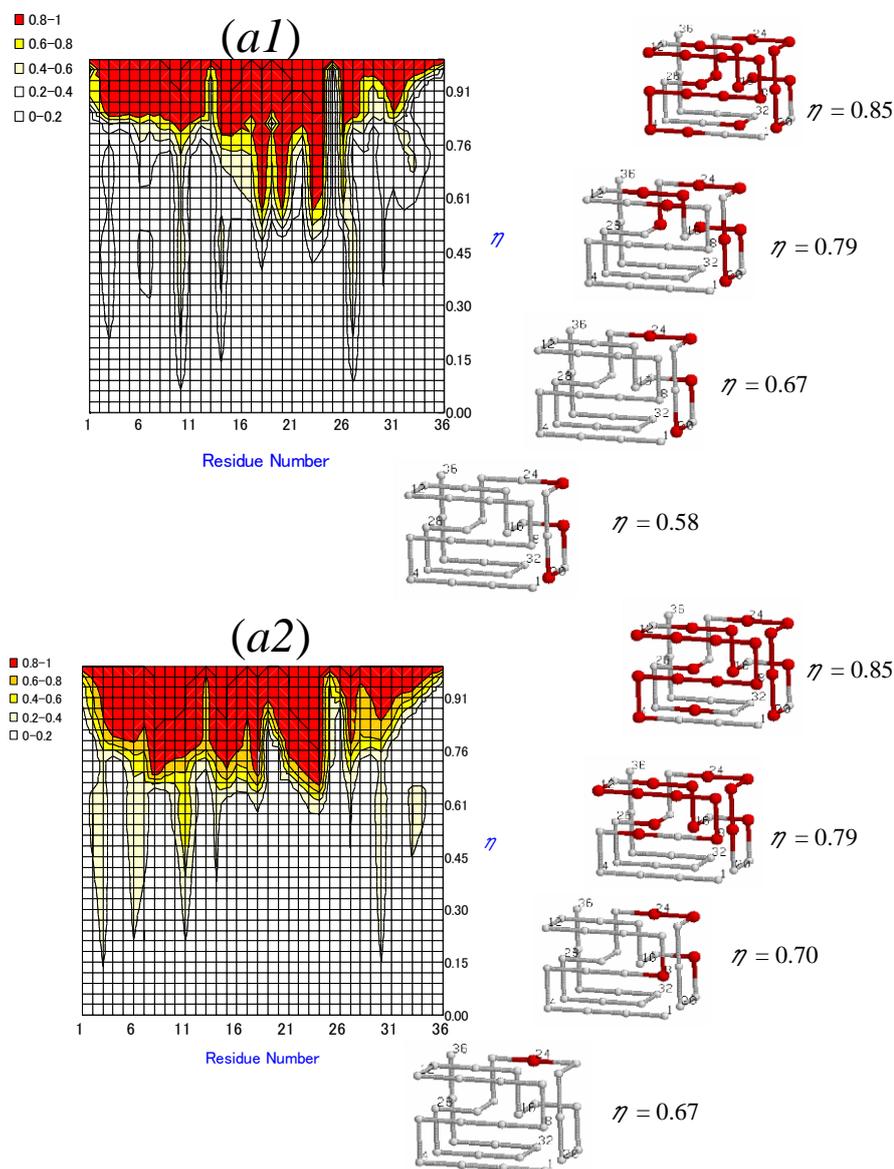
ϕ 値により求められたタンパク質のフォールディング過程

タンパク質 $a1$, $a2$, $b1$, $b2$ に対して、各アミノ酸残基が、反応座標 η で、部分的に天然状態と同じ構造を形成しているかどうかを推定する量 $\phi_i(\eta)$ を計算しよう。その結果が次の図である。これにより、それぞれのタンパク質のフォールディング過程を検証しよう。

η が小さいとき、一部のアミノ酸残基を除いて、 $\phi_i(\eta)$ は一般にかなり小さく、タンパク質は D 状態にあることを示している。

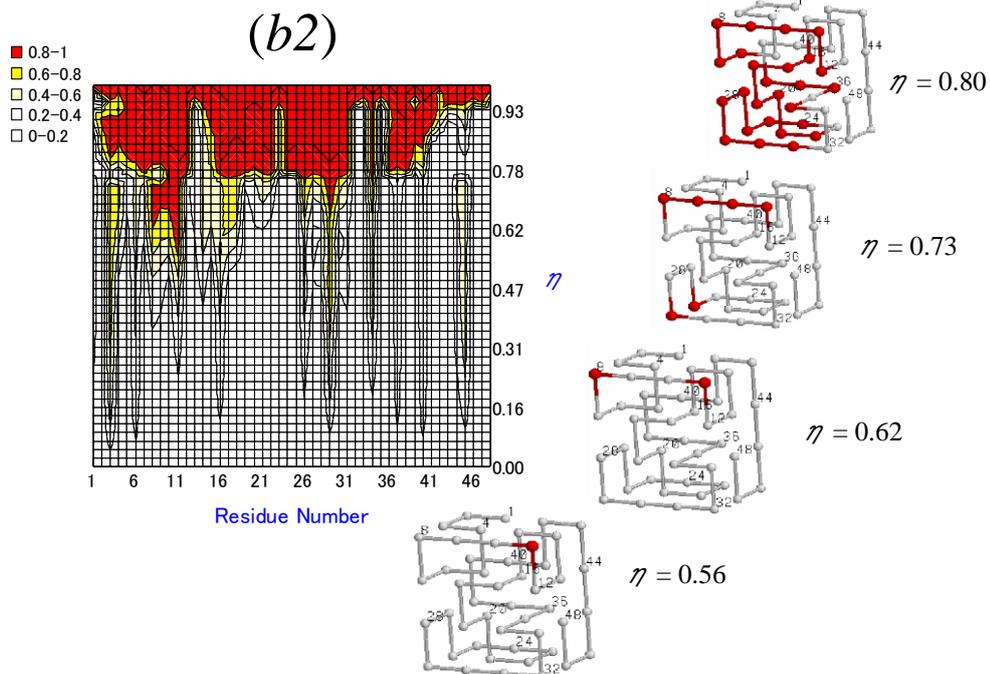
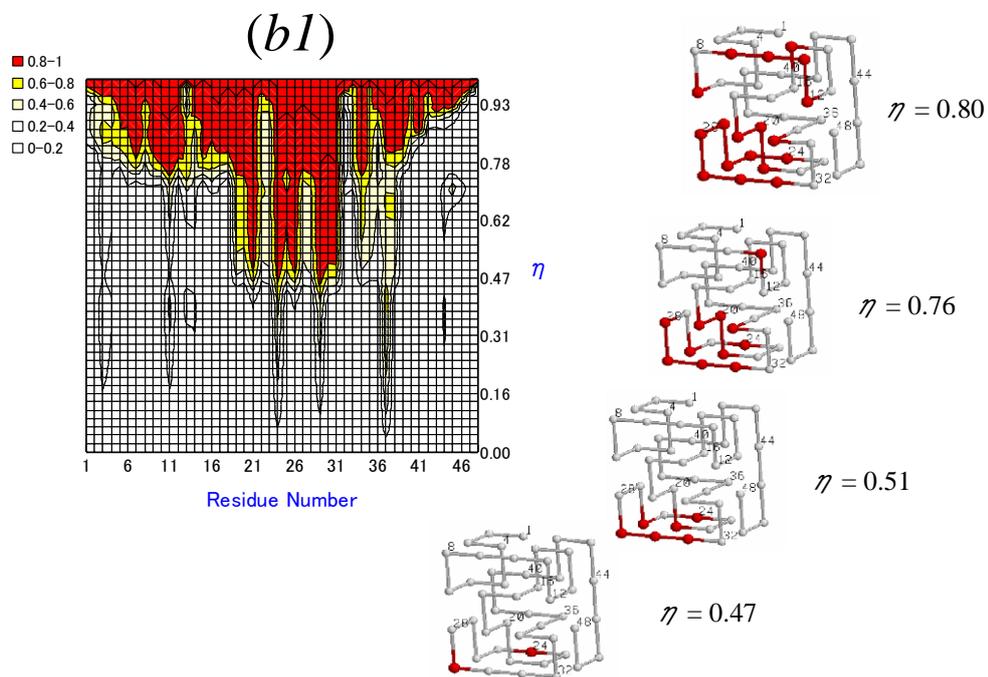
しかし、一部のアミノ酸残基部位については、 $\phi_i(\eta)$ は小さいながらもはっきりとしたピークをもち、完全なランダムではなく、N 状態がときおり出現していることがわかる。

そして η が大きくなり、0.6 から 0.8 付近を



越えると、 $\phi_i(\eta)$ は一気に 1 へと近づき、ほとんどのアミノ酸残基が N 状態へと移行する。

η が 0.6 から 0.8 付近（遷移状態とみなせる）で起こるこの急激な $\phi_i(\eta)$ の変化は、N 状態への折れたたみが協同的な現象であることを示している。





“Autumn Tree Night View”