

## 第11章

### 理論と実験による $\Phi$ 値の相関の検証\_その2

#### <要旨>

27個の実際のタンパク質の内、理論と実験による $\Phi$ 値の相関係数(CC)が0.6以上で天然構造が類似している2個のタンパク質 1ENH と 1IDY, 相関係数が良好なタンパク質 3CHY (CC=0.83), やや良好なタンパク質 1RNB (CC=0.42), 相関係数が良くないタンパク質 1FKB (CC=-0.40), 及び, 相関係数は良くないが円順列変異体で相関係数が改善されたタンパク質 1RIS (CC=0.17) を取り上げ, これらのタンパク質のフォールディング・メカニズムが「フレームワークモデル」か「核形成-凝縮モデル」か検討している.

特に, タンパク質 1FKB は, 長距離相互作用が要求される多くの $\beta$ シート構造をもつタンパク質であり, 統計力学モデルが適用できない典型的な例である.

また, 野生型タンパク質 1RIS は, A-W\_NILSモデルより求めた $\Phi$ 値が実験とほとんど一致しなかったが, 3個の円順列変異体では相関係数の改善がみられた. このことは, 3個の円順列変異体により, フォールディング・メカニズムの変更が起こっていると示唆される.



## 天然構造が類似している二つのタンパク質, “1ENH” と “1IDY” の フォールディング・メカニズムは?

天然構造が類似している 2 個のタンパク質, “1ENH” と “1IDY” について, 理論と実験の  $\Phi$  値の値を検証しよう.

### ○ “1ENH” (Engrailed homeodomain, 表の番号: 1)

- ・ アミノ酸残基数・・・54 個 (PDB のアミノ酸残基番号;3-56)
- ・ フォールディング・タイプ・・・All  $\alpha$
- ・ 2 次構造・・・ $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3$
- ・ 相関係数 (CC) の値;  $CC = 0.62$  (ただし, 二つのアミノ酸残基間の接触判断距離  $D_c = 5.5 \text{ \AA}$ ・・・理論と実験の相関が良い)

### ○ “1IDY” (c-Myb, 表の番号: 2)

- ・ アミノ酸残基数・・・54 個 (PDB のアミノ酸残基番号;140-193)
- ・ フォールディング・タイプ・・・All  $\alpha$
- ・ 2 次構造・・・ $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3$
- ・ 相関係数 (CC) の値;  $CC = 0.69$  (ただし, 二つのアミノ酸残基間の接触判断距離  $D_c = 4.0 \text{ \AA}$ ・・・(理論と実験の相関が良い))

<文献> Gianni, S., Guydosh, N.R., Khan, F., Caldas, T.D., Mayor, U., White, G.W.N, *et al.*

Unifying features in protein-folding mechanisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 13286-13291 (2003).

これら二つのタンパク質 “1ENH, 1IDY” は, 天然構造が類似しているので, フォールディング・メカニズムも同じであろうか?

### <実験による $\Phi$ 値>

“1ENH” の方は, 遷移状態で,  $\alpha 1$  ヘリックス領域と, ターン領域 ( $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  を繋いでいる領域) がフォールディング核を形成していると推定される. 一方, “1IDY” の方は, 遷移状態で, 2 次構造 (3 個のヘリックス) の形成が明確ではなく, 形成途中の段階のように推定される. Gianni らは論文の中で, “1ENH” のフォールディング・メカニズムは, 「フレームワーク モデル」で, “1IDY” の方は, 「フレームワーク モデル」と「核形成—凝縮モデル」の混合型であると推定している. つまり, “1IDY” の方は, 2 次構造と 3 次構造が, ほぼ同時に形成されると推定している.

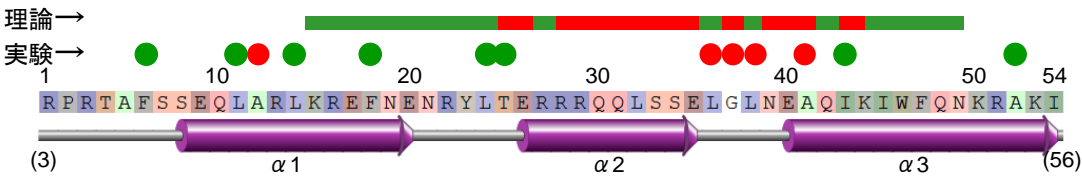
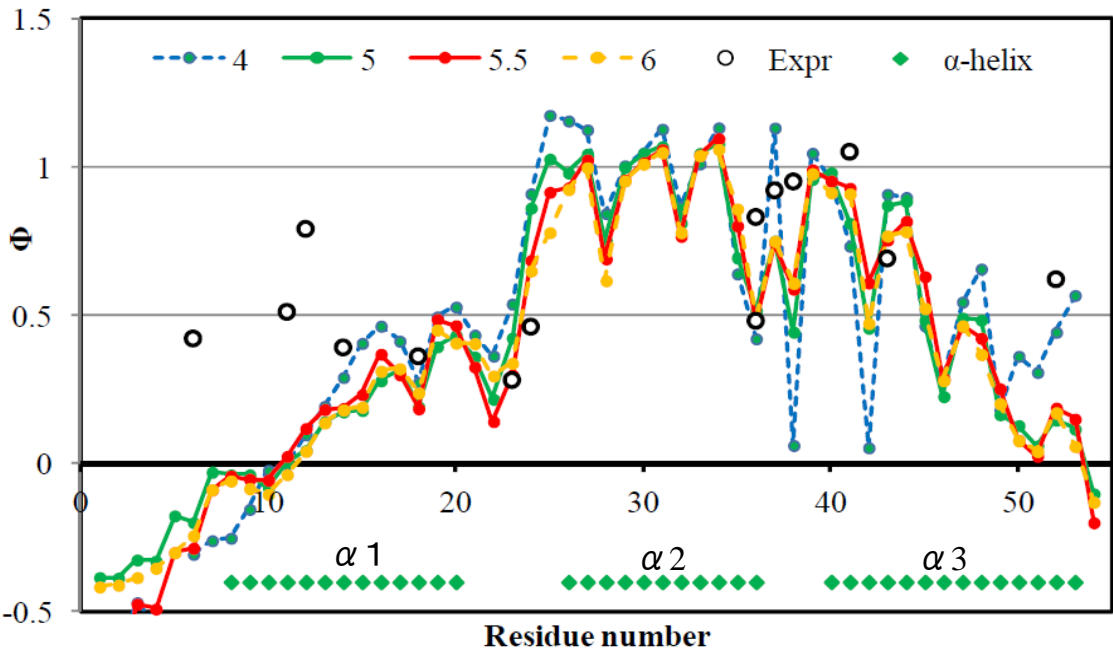
### <理論による $\Phi$ 値>

天然構造が類似している 2 個のタンパク質, “1ENH” と “1IDY” の理論による  $\Phi$  値の分布は, アミノ酸配列の相違を考慮していないので, ほぼ同じであり, 遷移状態で,  $\alpha 2$  ヘリックス近傍の領域がフォールディング核であると推定される.

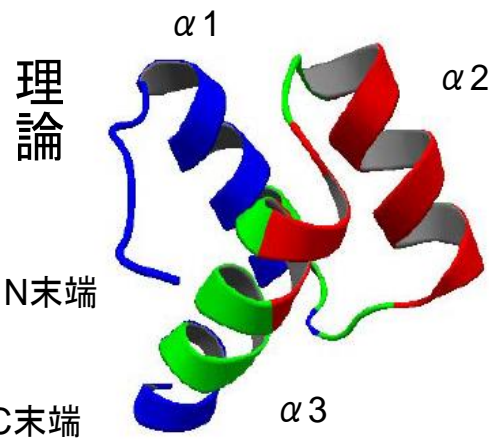
実験による  $\Phi$  値との相関は, 両方のタンパク質とも相関係数 (CC) が 0.6 以上であり, フォールディング・メカニズムは, 「フレームワーク モデル」に該当していると推定される.

次のページの図は, “1ENH”, 及び, “1IDY” の実験による  $\Phi$  値と, 理論による  $\Phi$  値を比較したものである. アミノ酸配列上と天然構造に重ね合わせて, 3 色で分類して描いている.

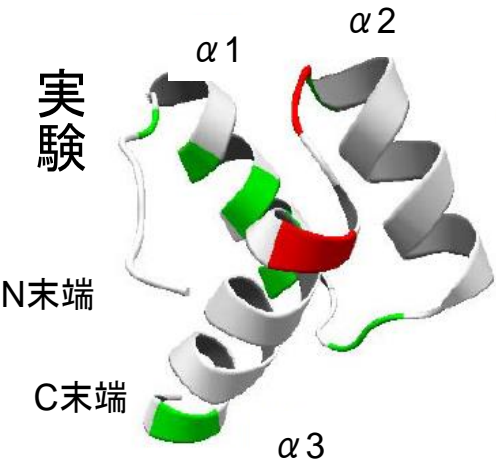
# En-HD ( Engrailed HomeoDomain,1ENH ) のΦ値 (理論と実験)



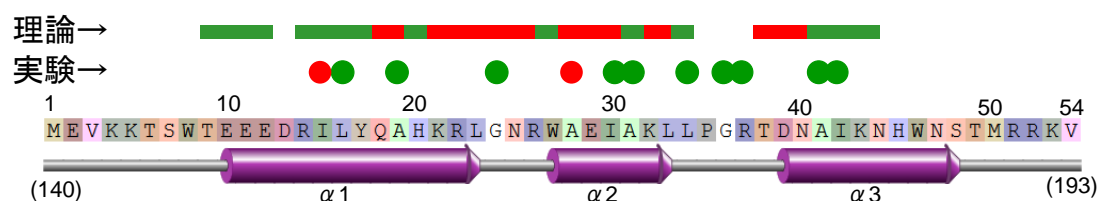
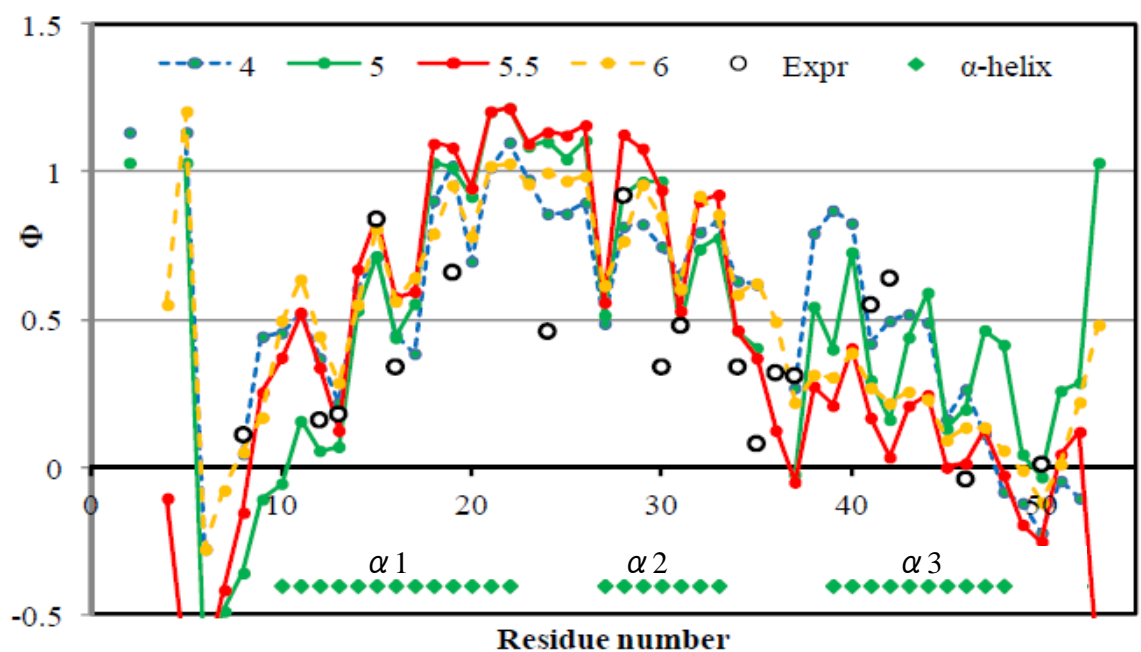
● ;  $0.75 \leq \Phi \leq 1.0$     ■ ;  $0.25 \leq \Phi < 0.75$     ▲ ;  $0.0 < \Phi < 0.25$



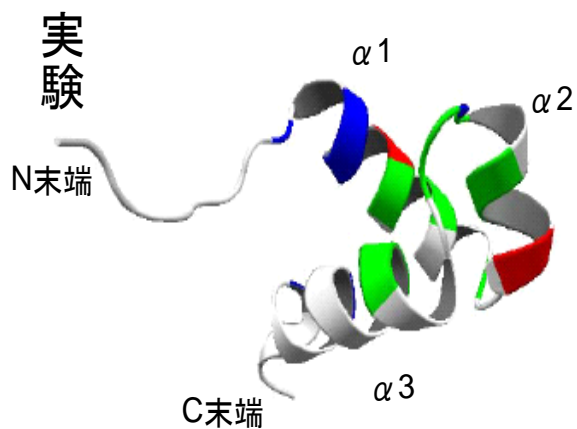
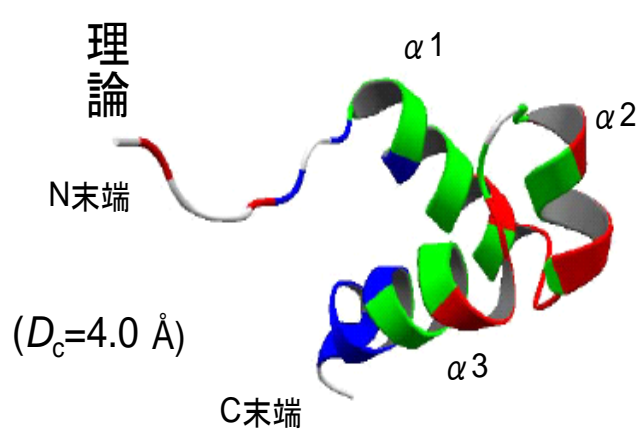
( $D_c=5.5 \text{ \AA}$ )



# c-Myb ( c-Myb-transforming protein ,1IDY)の $\Phi$ 値(理論と実験)



● ;  $0.75 \leq \Phi \leq 1.0$     ■ ;  $0.25 \leq \Phi < 0.75$     ▲ ;  $0.0 < \Phi < 0.25$





## タンパク質 “3CHY” (CheY) のΦ値の、理論と実験の比較

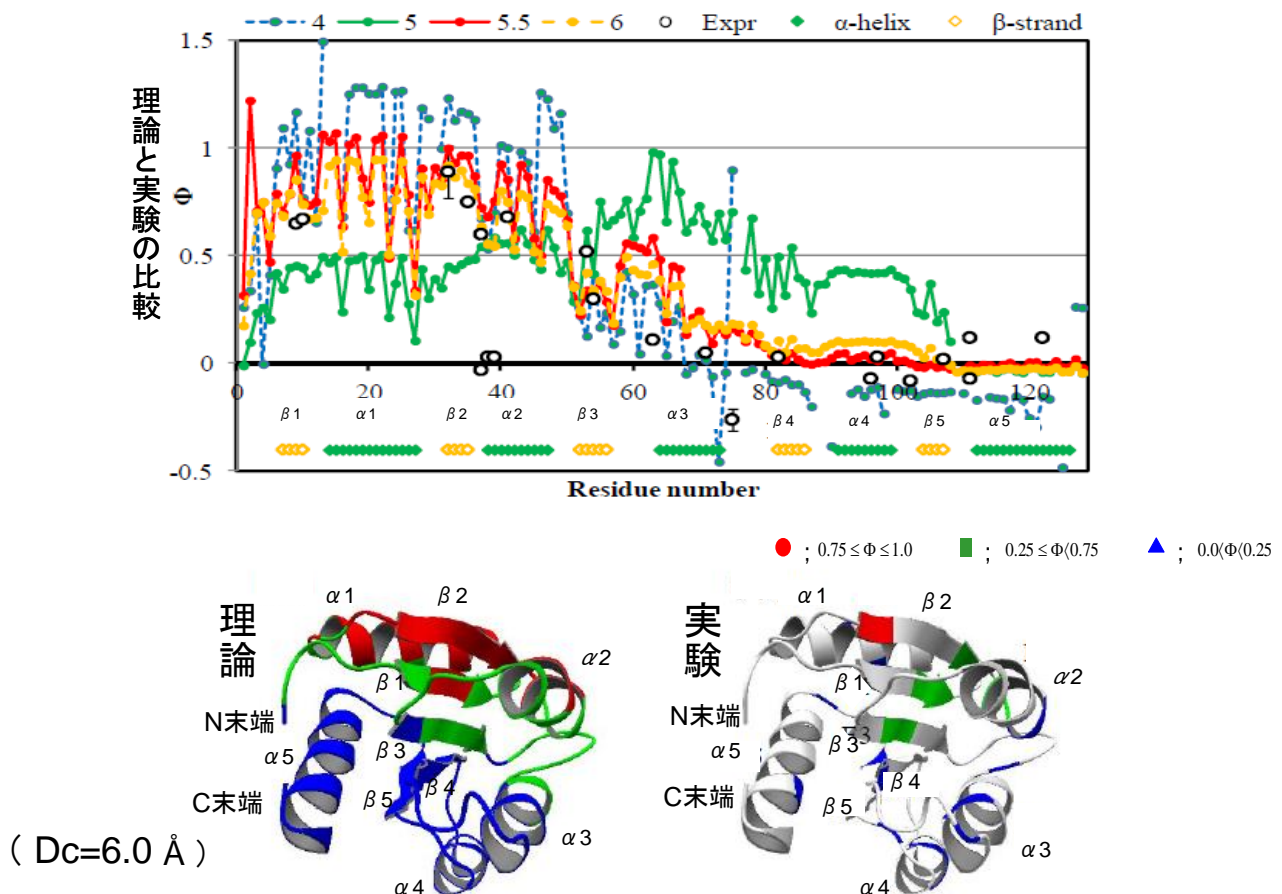
タンパク質 “3CHY” (CheY, 表の番号: 27) の天然構造の特徴とΦ値による遷移状態での構造の推定しよう。

- ・アミノ酸残基: 128 個, フォールディング・タイプ;  $\alpha/\beta$
- ・次のような2個のサブドメインからなる:
  - ① N-末端側のサブドメイン; ( $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3$ )
  - ② C-末端側のサブドメイン; ( $\beta 3-\alpha 3-\beta 4-\alpha 4-\beta 5-\alpha 5$ )
 ... ( $\beta 3$  シートは, 2 個のサブドメインに共通)
- ・理論で, 二つのアミノ酸残基間の接触判断距離  $D_c = 6.0 (\text{\AA})$  のとき, 実験との相関係数は  $CC = 0.83$  で, 非常に高いので, フォールディング・メカニズムは, 「フレームワーク モデル」に該当していると推定できる。
- ・実験で大きなΦ値をもつアミノ酸残基はN-末端側のサブドメイン領域である。従って, 遷移状態での “フォールディング核” は, 次の領域であると推定される: 『N-末端側のサブドメインの領域 “ $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ ”』
- ・遷移状態では, C-末端側のサブドメインは形成されていない。

下図は, “3CHY” の実験によるΦ値と, 理論によるΦ値を比較したものである。アミノ酸配列上と天然構造に重ね合わせて, 3色で分類して描いている。

<文献> Lopez-Hernandez, E. & Serrano, L. Structure of the transition state for folding of the 129 aa protein CheY resembles that of a smaller protein, CI-2. *Fold. Des.* **1**, 43-55 (1996).

### 3CHY (CheY) のΦ値 (理論と実験)





## タンパク質 “1RNB” の $\Phi$ 値の、理論と実験の比較

タンパク質 “1RNB” の  $\Phi$  値の理論と実験の相関係数 (CC) の値は、 $CC = 0.42$  (ただし、 $D_c = 5.0 \text{ \AA}$ ) で、 $0.3 \leq CC < 0.6$  の場合に相当し、“フレームワーク モデル” か、“核形成—凝縮モデル” かの、どちらでも説明可能である。

タンパク質 “1RNB” (barnase, 表の番号 : 24 ) の特徴 :

- ・ アミノ酸残個数・・・109 個
- ・ フォールディング・タイプ・・・ $\alpha + \beta$
- ・ 2 次構造・・・『  $\alpha 1 - \beta 1 - \alpha 2 - \alpha 3 - \beta 2 - \beta 3 - \beta 4 - \beta 5 - \beta 6$  』
- ・ 相関係数 (CC) の値 ;  $CC = 0.42$

( ただし、二つのアミノ酸残基間の接触判断距離  $D_c = 5.0 \text{ \AA}$  )

### <実験での $\Phi$ 値>

- ・ 遷移状態での  $\Phi$  値は  $\beta 2$  シートと  $\alpha 1$  ヘリックスの C 末端領域で 1.0 近傍の値をとり、この領域の 2 次構造が形成されていると推定できる。→『**核形成—凝縮モデル**』と推定。

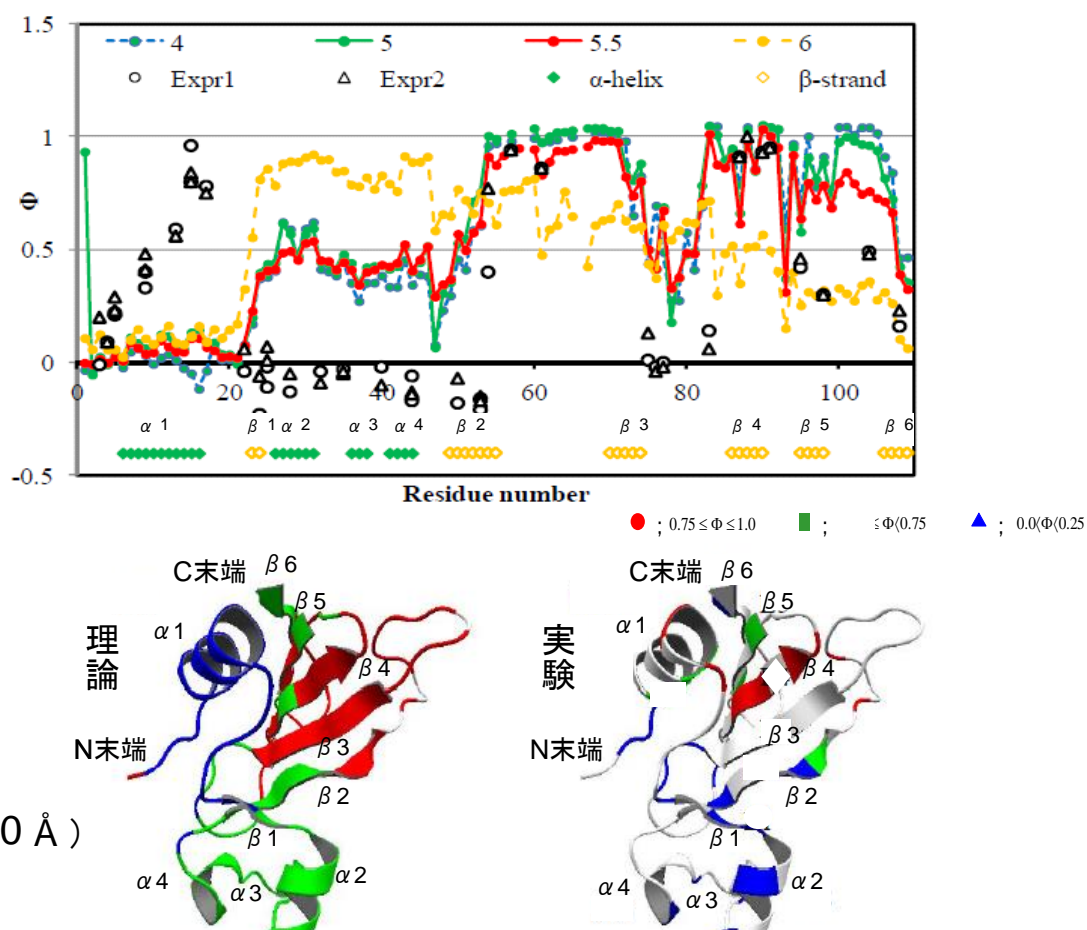
### <理論での $\Phi$ 値>

- ・ 遷移状態での  $\Phi$  値は、 $\beta 3$  シートと  $\beta 4$  シートの間のターン領域と、 $\beta 4$  シート～ $\beta 5$  シートの領域で 1.0 に近い値をもち、この領域がフォールディング核とみなせる。

下図は、“1RNB” の実験による  $\Phi$  値と、理論による  $\Phi$  値を比較したものである。アミノ酸配列上と天然構造に重ね合わせて、3 色で分類して描いている。

<文献> Serrano, L., Matouschek, A. & Fersht, A.R. The folding of an enzyme. III. Structure of the transition state for unfolding of barnase analysed by a protein engineering procedure. *J. Mol. Biol.* **224**, 805-818 (1992).

## 1RNB (barnase) の $\Phi$ 値 (理論と実験)







## タンパク質 “1FKB” の $\Phi$ 値の、理論と実験の比較

タンパク質 “1FKB” (EFKBP12, 表の番号 ; 23) は、理論的に計算された $\Phi$ 値と、実験で観測された $\Phi$ 値との相関が低く (相関係数:  $CC < 0.3$ ), “A-W\_NILS モデル” の仮定そのものが破綻していて、我々の統計力学モデルが適用できない典型的な例である。その主な理由は、長距離相互作用が要求される多くの $\beta$ シート構造をもつタンパク質であることが考えられる。

### “1FKB”の特徴 :

- ・ アミノ酸残個数・・・107 個
- ・ フォールディング・タイプ・・・ $\alpha + \beta$
- ・ 2次構造・・・『  $\beta 1-\beta 2-\beta 3-\beta 4-\alpha 1-\beta 5-\alpha 2-\beta 6$  』
- ・ 相関係数 (CC) の値 ;  $CC = -0.40$

(ただし、二つのアミノ酸残基間の接触判断距離  $D_c = 5.0 \text{ \AA}$ )

### <実験での $\Phi$ 値>

- ・ 遷移状態での $\Phi$ 値は 0.4 近傍で、2次構造は完全には形成されていない。  
→ 『**核形成—凝縮モデル**』 (the nucleation-condensation model) とみなせる。

### <理論での $\Phi$ 値>

- ・ 遷移状態での $\Phi$ 値は、 $\beta$ シートと $\alpha 1$ ヘリックス近傍で 1.0 に近い値をもちフォールディング核とみなせる。

### <特記>

タンパク質 “1FKB” で、理論的な $\Phi$ 値を求めるために、相互作用を強めて ( $U = \varepsilon + 0.01$ ) 計算するとき、あるアミノ酸残基の部位で $\Phi$ 値の異常値 ( $\Phi > 1.0$  や  $\Phi < 0.0$ ) が発生することがある。

実験でも、置換するアミノ酸基の部位や、置換するアミノ酸残基の種類によって $\Phi$ 値の異常値が出ることがあり、置換したアミノ酸残基が何らかの影響を与えていると説明されるが、理論計算では、アミノ酸残基を置換しても、元の立体構造は変化しないと仮定しているので、このような説明は成立しない。理論的に $\Phi$ 値を求める手法そのものに、不安定化させる要因が内在しているかもしれない。

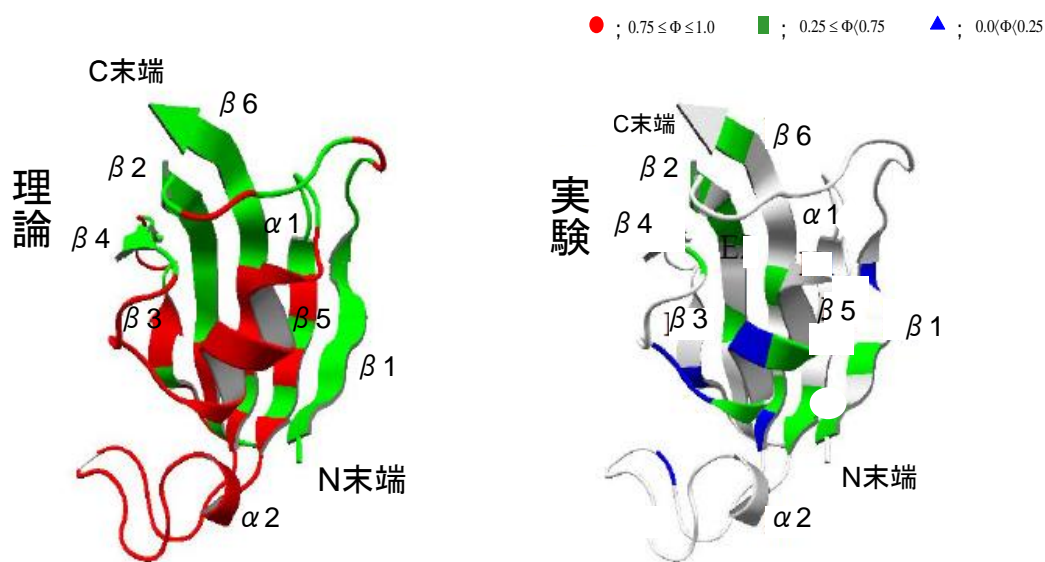
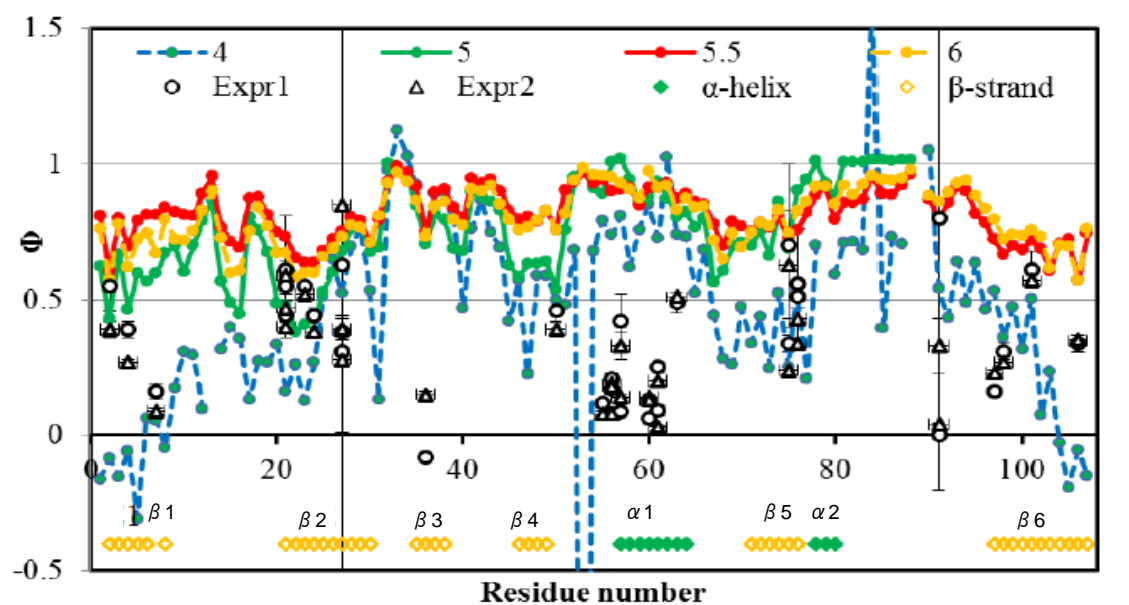
<文献> Fulton, K.F., Main, E.R.G., Daggett, V. & Jackson, S.E. Mapping the interactions present in the transition state for unfolding/folding of FKBP12. *J. Mol. Biol.* **291**, 445-461 (1999).

次のページの図は、“1FKB” の実験による $\Phi$ 値と、理論による $\Phi$ 値を比較したものである。アミノ酸配列上と天然構造に重ね合わせて3色で分類して描いている。



“Summer Evening beside Lake”

## 1FKB (FKBP12) のΦ値 (理論と実験)



(  $D_c=5.0 \text{ \AA}$  )





## タンパク質 “1RIS” のΦ値に対する、実験と理論の比較

タンパク質 “1RIS” (ribosomal protein S6, 表の番号 ; 21) は、理論的に計算されたΦ値と、実験で観測されたΦ値との相関が低く ( 相関係数 :  $CC < 0.3$  ), “A-W\_NILS モデル” の仮定そのものが破綻していて、我々の統計力学モデルが適用できない典型的な例である。その主な理由は、長距離相互作用が要求される多くのβシート構造をもつタンパク質であることが考えられる。

### タンパク質 “1RIS” の特徴 :

- ・ アミノ酸残個数・・・97 個
  - ・ フォールディング・タイプ・・・  $\alpha + \beta$
  - ・ 2次構造・・・『  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$  』
  - ・ 相関係数 (CC) の値 ;  $CC = 0.17$
- ( ただし、二つのアミノ酸残基間の接触判断距離  $D_c = 4.0 \text{ \AA}$  )

### <実験でのΦ値>

- ・ 実験によるΦ値から遷移状態では、両末端部分 (N 末端と C 末端) の構造が形成されていると推定される。アミノ酸配列の中央部は構造形成されていない。
- ・ “フォールディング核は、( $\beta 1-\alpha 1-\beta 3$ ) からなる “ $\alpha 1$ -nucleus” と ( $\beta 1-\alpha 2-\beta 4$ ) からなる “ $\alpha 2$ -nucleus” であると推定される。
- ・ これらの二つのフォールディング核が競合してフォールドすると推定される。

<文献> Otzen, D.E. & Oliveberg, M. Conformational Plasticity in Folding of the Split  $\beta - \alpha - \beta$  Protein S6: Evidence for Burst-Phase Disruption of the Native State. *J. Mol. Biol.* **317**, 613-627, 2002.

### <理論でのΦ値>

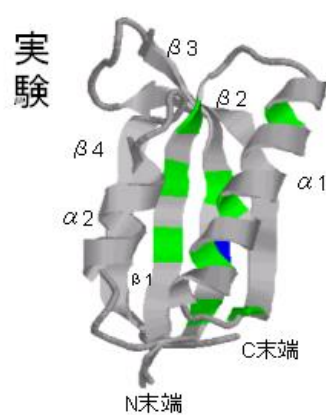
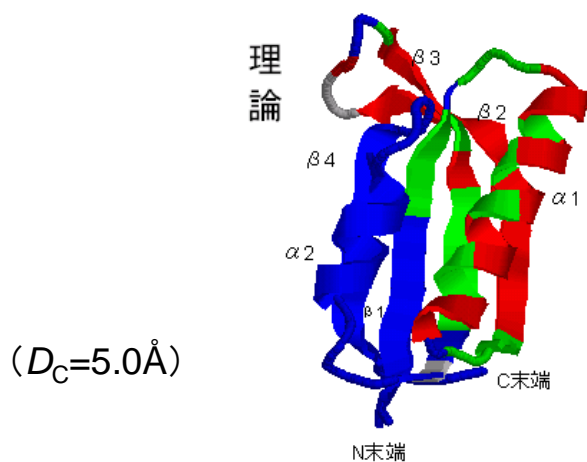
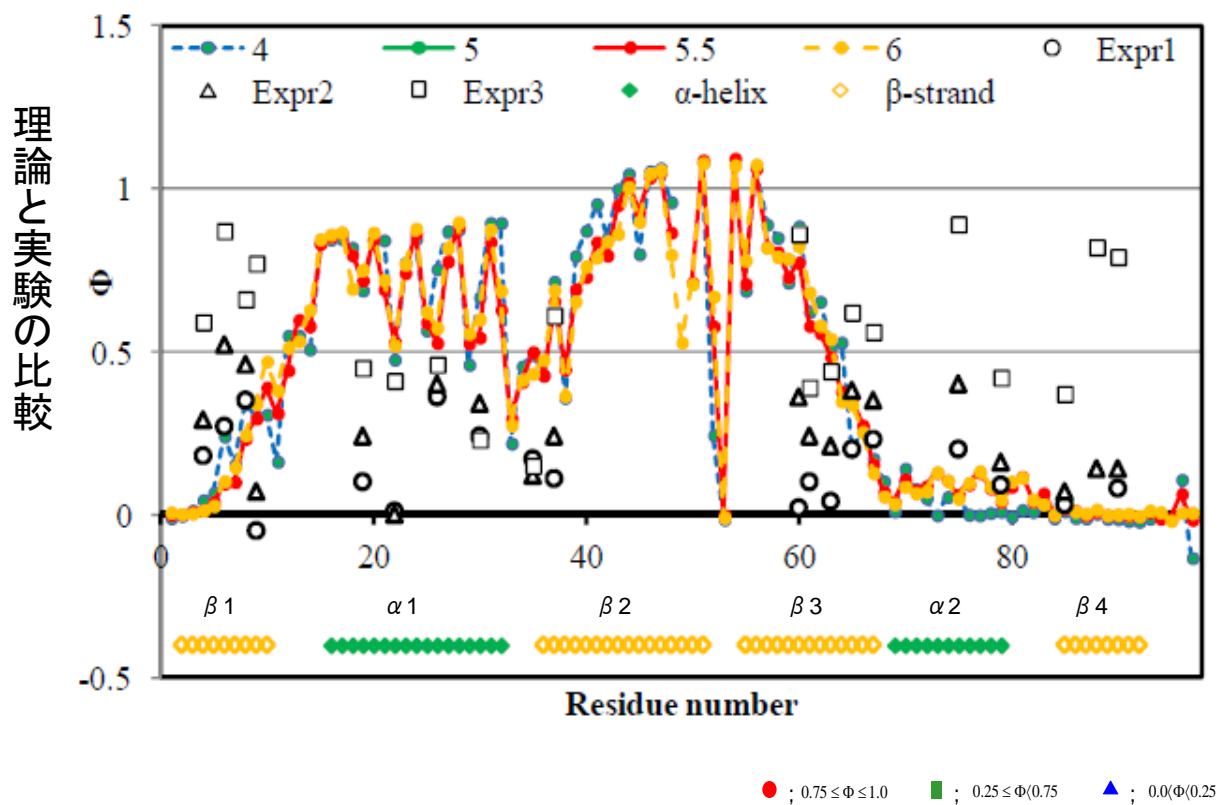
- ・ 理論でのΦ値は、 $\alpha 1$ -領域と  $\beta 1$ -領域で大きいので、これらの部位がフォールディング核と推定される。
- ・ 「A-W\_NILS モデル」を用いて理論的に計算されたΦ値は、実験的に観測されたΦ値とほとんど一致しない結果が得られた。フォールディングに対する“統計力学モデルの仮定”そのものが破綻している、つまり、1RIS のフォールディング・メカニズムは“核形成—凝縮モデル”に該当すると推定される。

次のページの図は、“1RIS”の実験によるΦ値と、理論によるΦ値を比較したものである。アミノ酸配列上と天然構造に重ね合わせて3色で分類して描いている。



“Trees on the Hill At Night”

# 1RIS (Ribosome protein S6) の $\Phi$ 値 (理論と実験)



2008年, Haglundらは, 次のような, タンパク質 “1RIS” (ribosomal protein S6) の5個の円順列変異体を作成して, それぞれの $\Phi$ 値をもとめて, フォールディング・キネティクスの変化を議論している:

$P^{13-14}, P^{33-34}, P^{54-55}, P^{68-69}, P^{81-82}$

彼らは, 次のような手順で “1RIS” の円順列変異体を作成している:

- ① まず, タンパク質のアミノ酸配列の N 末端と C 末端とを適当なリンカー配列で共有結合する.
- ② 次に, もとのアミノ酸配列の適当な部位 (特に, 2 次構造のつなぎ目) を意識して, ペプチド結合を一カ所を切断し新たな末端 (N 末端と C 末端) とする. 例えば,  $P^{13-14}$  は,  $\beta 1$  と  $\alpha 1$  のつなぎの部分である, アミノ酸残基 13 番目と 14 番目を切断して, その部位を両末端とする.

この円順列変異体の隣り合うアミノ酸の配列は, もとの野生型と同じで完全に保存されている (ただし, 末端部分だけが異なっている). しかしながら, 野生型と円順列変異体の両方のアミノ酸配列を N 末端側から並べて比べてみると, ほぼ異なるアミノ酸配列である. 両方のアミノ酸配列間の同一性は, たかだか約 5% 程度である.

次に, 我々は, Haglund らが実験した, “1RIS” の 5 個の円順列変異体の  $\Phi$  値を理論的に計算した. その結果,  $\Phi$  値の理論と実験の間の相関係数は, 次のようになった:

タンパク質	野生型(wt)	$P^{13-14}$	$P^{33-34}$	$P^{54-55}$	$P^{68-69}$	$P^{81-82}$
相関係数(CC)	0.20	0.89	0.47	0.57	-0.16	-0.20

<文献> Haglund, E., Lindberg, M.O. & Oliveberg, M. Changes of protein folding pathways by circular permutation. Overlapping nuclei promote global cooperativity. *J. Biol. Chem.* **283**, 27904-27915, 2008.

<文献> H. Wako and H. Abe, Calculation of Free-Energy Profiles, Folding Rates and  $\Phi$  Values by Means of a Simple Statistical-Mechanical Model of Protein Folding, in *Advances in Protein Folding Research*, M. Hale ed., Nova Sci. Pub. Inc., pp. 19-63, 2016.

<文献> H. Wako and H. Abe, Characterization of Protein Folding by a  $\Phi$ -value calculation with a Statistical-Mechanical Model. *Biophysics and Physicobiology*, Vol. 13, pp. 263-279, 2016.

これは, 何を意味するのだろうか?

我々の “簡単な統計力学的モデル” より求めた  $\Phi$  値が, 野生型 “1RIS” では, ほとんど一致しなかったが, 3 個の円順列変異体 ( $P^{13-14}, P^{33-34}, P^{54-55}$ ) では, 相関係数 (CC) の改善がみられた. このことは, フォールディング・メカニズムは, “核形成—凝縮モデル” ではなく, “フレーム ワーク モデル” が適合するとみなしてよいのでないだろうか. つまり, アミノ酸配列における, 2 次構造の順序を入れ替えただけで, フォールディング・メカニズムが変更するのではないかと推論できる.

野生型, 及び, 3 個の円順列変異体  $P^{13-14}, P^{33-34}, P^{54-55}$  の 2 次構造の順序は次の通りである:

野生型:  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$

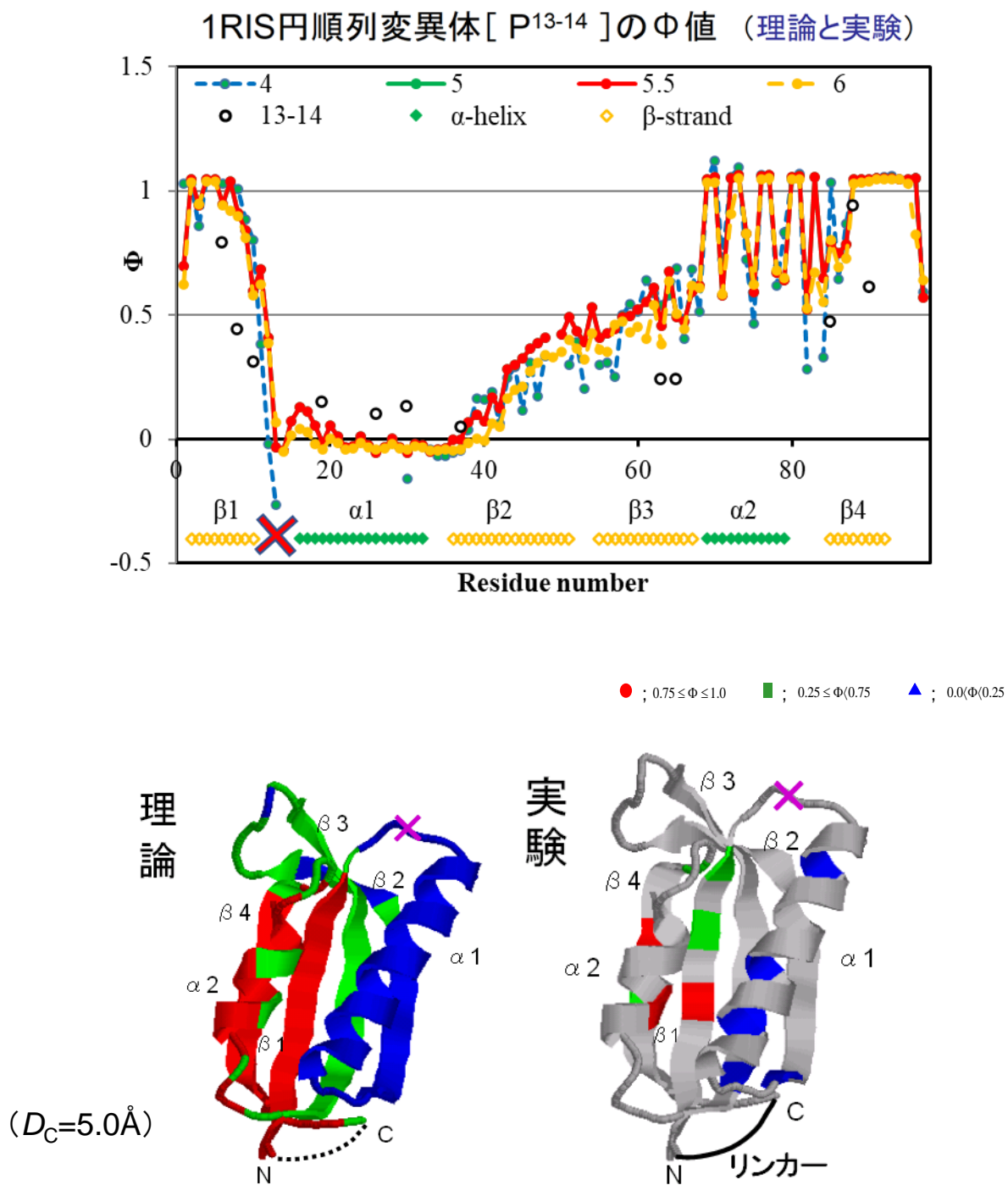
$P^{13-14}$ :  $\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 1$

$P^{33-34}$ :  $\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 1-\alpha 1$

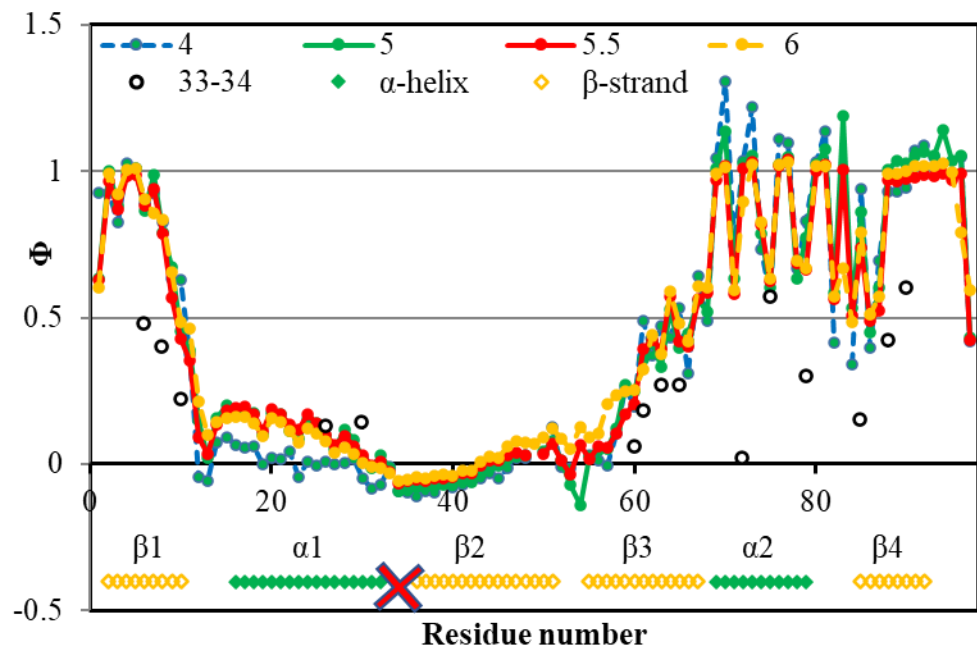
$P^{54-55}$ :  $\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 1-\alpha 1-\beta 2$

3 個の円順列変異体で, 共通の 2 次構造の順序が, 『 $\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 1$ 』のとき, フォールディング・メカニズムは, 「フレーム ワーク」モデルに適合すると推論できる.

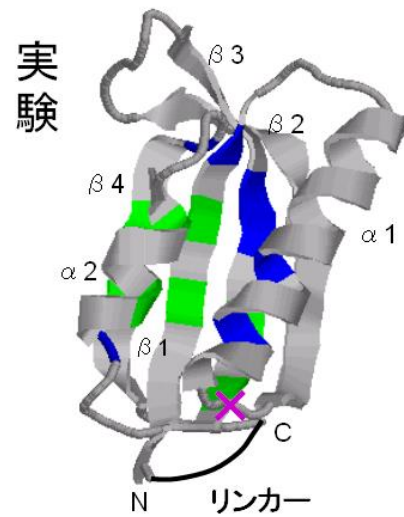
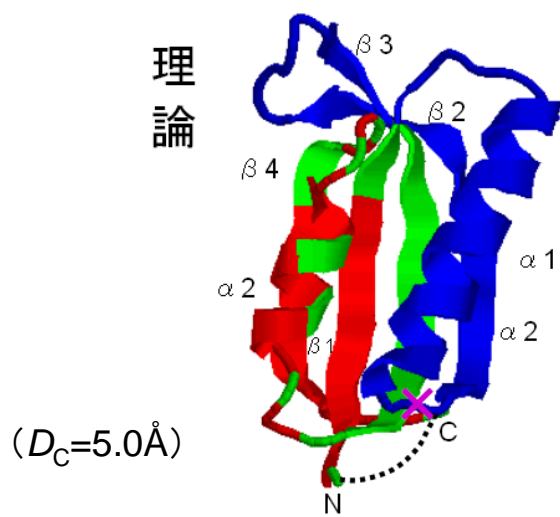
例として, 2 個の円順列変異体 (  $P^{13-14}$ ,  $P^{33-34}$  ) の  $\Phi$  値の実験と理論の結果を下図と次のページに示す. アミノ酸配列上と天然構造に重ね合わせて 3 色で分類して描いている.



# 1RIS円順列変異体 [ P<sup>33-34</sup> ] のΦ値 (理論と実験)



● ;  $0.75 \leq \Phi \leq 1.0$     ■ ;  $0.25 \leq \Phi(0.75)$     ▲ ;  $0.0(\Phi(0.25))$







“Autumn Night “