

第8章

タンパク質フォールディングの遷移状態の構造を推定するΦ値解析とは？

<要旨>

タンパク質フォールディング過程を反応座標で表現した自由エネルギー関数に、何故ピークが表れるかを考察している。ピークは、フォールディングにおける遷移状態 (transition state) に対応していて、この遷移状態での構造的特徴を推定できる、組み換えDNA技術によるアミノ酸置換の変異体を利用した“Φ値解析法”を紹介している。

一方、3次元格子タンパク質に対して、野生型タンパク質のフォールディング・レートと、変異体のアンフォールディング・レートから、理論的にΦ値を求める式を導いている。

そして、具体的に3次元格子タンパク質の各アミノ酸残基のΦ値を求め、遷移状態でのフォールディング核を推定している。その結果、3次元格子タンパク質の同じ天然構造であっても、アミノ酸配列が異なるタンパク質では、それぞれ、異なるセグメント領域のフォールディング核をもち、それ故、異なるフォールディング過程であると推定している。



タンパク質・フォールディングの“遷移状態”とは？

1970年代以降に行われた、タンパク質のフォールディングの実験において、次のことが観測された：『小さな球状タンパク質では、変性状態から天然状態へのフォールディングの途中で、準安定状態である寿命の短い中間体は観測されない、二状態転移である。』

タンパク質のフォールディング過程を反応座標で表現した“自由エネルギー関数”の特徴は、天然状態（N状態）とランダムコイル状態（D状態）に対応する反応座標のところに、それぞれ極小値をもち、その中間の位置にピークがあることである。このピークに対応する状態を“遷移状態”（transition state）と呼ぶ。この遷移状態を乗り越えるときに形成される部分構造は多様であろう。遷移状態での多様な構造を“遷移状態アンサンブル”と呼ぶことにする。しかしながら、遷移状態アンサンブルはタンパク質の天然構造の形に応じて、ある程度制限は受けるであろう。

タンパク質のフォールディング過程における“変性状態の構造”や、“中間体の構造”，そして“天然状態の構造”については、X線やNMRなどにより直接的な観測が可能である。だが、X線やNMRなどを用いて、この“遷移状態の構造”を直接観測することは、その性質上、ほぼ不可能であろうと思われる。二状態性を示す小さな球状タンパク質のフォールディング過程の“遷移状態の構造”を推定することは原理的に大変難しいと思われた。この“遷移状態の構造”を推定する方法があるだろうか？“遷移状態で何が起きているのか”を調べるのが可能だろうか？

今日、遺伝子工学が発展した結果、タンパク質のアミノ酸配列において、任意のアミノ酸残基の置換・欠失・挿入などを自在に行うことが出来るようになった。これを“変異体タンパク質”と呼ぶ。タンパク質フォールディングに関する研究にも、タンパク質工学的に創製した“変異体タンパク質”を利用することができるようになり、タンパク質のフォールディング過程の“遷移状態の構造を推定する”新たな方法が可能になった。

1990年代のはじめに、Fershtらは、“Φ値解析法”という新たな手法により、フォールディング過程の“遷移状態での構造的特徴を推定する”ことを可能にするような画期的な方法を提案した。彼らは、組み換えDNA技術によるアミノ酸置換の変異体を利用して、フォールディングの遷移状態において各アミノ酸残基の状態が、部分的に、天然状態かどうかを知る方法を考えた。

<文献> Fersht, A.R., Matouschek, A. & Serrano, L.: The folding of an enzyme. 1. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding, *J. Mol. Biol.*, 224:771-782, 1992..

<文献> A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (Freeman, New York, 1999). (日本語訳：桑島邦博・有坂文雄・熊谷泉（訳），タンパク質の構造と機能，医学出版(2006))

我々は、彼らによって導入されたΦ値解析という方法によって、“3次元格子タンパク質フォールディングの遷移状態での構造”を推定しよう。そして、次章では、Φ値解析の方法を“実際のタンパク質”に適用しよう。

まず、一般に、二状態転移が観測されるタンパク質のフォールディング過程を表現している自由エネルギープロファイルについて考察しよう。



二状態転移における自由エネルギー関数

右図は、タンパク質フォールディングの転移温度（ $T = T_m$ ）での二状態転移における自由エネルギーを秩序度（フォールドの程度を表す量）の関数として模式的に描いたものである。図中で、N：天然状態，‡：遷移状態，D：ランダムコイル状態（変性状態）を示している。

この自由エネルギー関数の特徴は、天然状態（N 状態）とランダムコイル状態（D 状態）に対応する秩序度のところに、それぞれ極小値をもっていることである。

N 状態での極小点付近は、その構造がほぼ一つの特異的立体構造であることを反映して幅が狭いのに対して、D 状態での極小点は、この付近での秩序度に対して広範囲の状態の集まりを反映して幅広い。これらの二つの極小点の間には、自由エネルギー曲線でピークがある。このピークに対応する状態が“遷移状態”である。

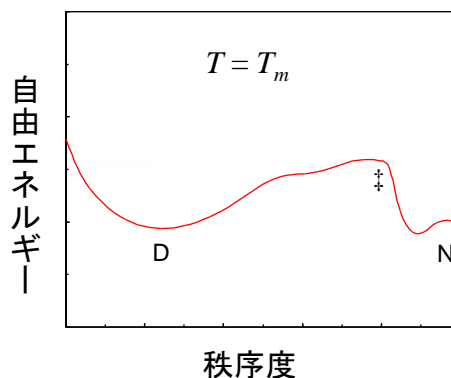
タンパク質のフォールディング過程の描像は次の様であろう：

『最初は、ペプチド鎖がランダムコイル状態で揺らいでいて、あちこちの部位で局所構造を形成するが、相互作用するアミノ酸残基数が少ないため獲得するエネルギーが小さく、構造が制限されたことにより失うエントロピーを上回ることができないので、ほとんどの場合、もとのランダムコイル状態に戻ってしまうであろう。たまたま、短距離相互作用によって形成されたいくつかの局所構造同士がぶつかって合体し、中距離・長距離相互作用によって、ある程度の大きさをもった局所構造が形成されると、自由エネルギーのピークを越え、天然構造へとフォールドする。』

局所構造がある程度の大きさをもつことが必要であり、そのような局所構造を“核”と呼ぶ。核が形成され、ひとたび自由エネルギーの山を越えると、タンパク質分子は、天然構造へと一気にフォールドすることになる。

郷信広は、1983 年の日本生物物理学会誌「生物物理」で、タンパク質分子が変性状態から天然状態へのフォールディング過程を、上で示したような自由エネルギー曲線を用いて、次のように詳細に解説している：

『・・・小さな球状蛋白質の変性・再生転移のもっとも基本的な統計物理学的特徴は、その二状態性にある。転移中点におけるいろいろな立体構造の分布をみると、いわゆる変性状態と生の状態における特異的立体構造（再生状態）のところにピークをもつことを、これは意味する。中間状態の分布密度は低い。・・・それから計算し得る量 $-k_B T \ln(\text{分布密度})$ は、系が、反応座標（折れたたみを記述する適当な変数）のある与えられた値で特徴付けられる状態にあるときの自由エネルギーである（ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度である）。状態分布の 2 つのピークに対応して、自由エネルギー曲線には、2 つの極小が存在し、その間には山がある。この山は変性・再生転移の活性化状態に対応している。活性化状態は一種の臨界状態で、この状態より再生状態側にある分子はさらに折れたたまれる傾向があり、変性側にある分子は、折れたたみはほどける傾向がある。言い換えれば、活性化状態から遠ざかる方向の統計的力をうける。この力は統計的であるから揺らぎとして活性化状態の山の方向に近づく分子もあるであろうが、平均としては山から遠ざかる方向に動く。・・・変性状態にある分子は、自由エネルギー曲線の変性状態側の極小点の周りを行ったり来たりしている。時には活性化状態に近づくであろうが、大体はもとに戻ってしまう。こうして分子は長らく変性状態にとどま



る。極稀には、大きく揺らいで活性化状態の山を越えることもある。一旦超えれば、折れたたみが進行する方向に統計的力が働いてほとんど確実に再生状態に至る。・・・分子が変性状態の極小点の周りを行ったり来たりしているときには、実は、短距離相互作用によって形成された不安定な局所構造ができたり壊れたりしていると考える。そのような局所構造を、相転移の統計力学の用語にならって、“胚”と呼ぶ。胚はそれ自身では不安定である。・・・胚は揺らぎによって自分自身に近接している鎖を取り込んで成長したり、他の胚とぶつかってうまくすれば合体して成長することもあるだろう。・・・胚が成長してある臨界的な大きさに達したものを“核”と呼ぶ。・・・核とは変性・再生途上の活性化状態にある分子中にみられる秩序構造である。・・・』(郷信広、『蛋白質の立体構造予測と折れたたみ過程』, 生物物理, Vol. 23 No.3, 11-19, 1983)

天然構造とランダム構造の差は、エンタルピー (H) およびエントロピー項 (ST) が 100kcal/mol のオーダーであるのに対して、その差である自由エネルギーは 5~15kcal/mol ほどである。1つの疎水性相互作用, 水素結合, 塩結合などの自由エネルギーへの寄与が 1~3kcal/mol であることを考えると、きわめて微妙なバランスの上に立体構造の安定性は保たれていることになる。しかも、一部のアミノ酸置換が安定性に大きく影響を及ぼすこともあれば、さほど影響しない場合もあり、タンパク質立体構造の安定性は、個々のアミノ酸の性質の単純な総和では議論することはできない。より大きな二つ以上のドメインからなるタンパク質の場合は、そのフォールディングは二状態的ではなく、中間状態を経ることが多いが、やはり協同的であり、現象の基本は、小さい球状タンパク質のフォールディングの示す二状態性にある。



なぜ自由エネルギー曲線に極大点が存在するのか？

自由エネルギー曲線のピークに対応する遷移状態が、如何にして表れるのだろうか？

図で、横軸は、フォールディングの進行変数である“秩序度”であり、0.0：ランダムコイル状態、1.0：天然状態に対応している。

自由エネルギーは、エンタルピー (H) 曲線とエントロピー項 ($-ST$) の曲線の和で表される： $F = H + (-ST)$

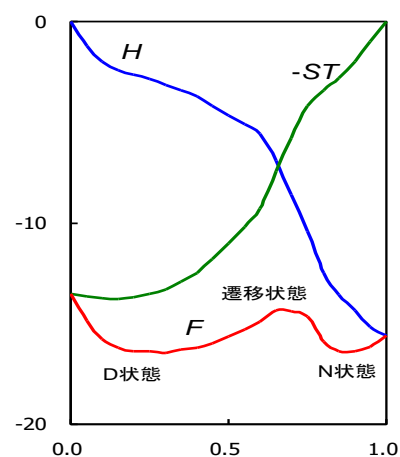
秩序度が 0.0 である D 状態では、獲得エネルギー (H) は 0 である。

D 状態は無数のランダムコイル状態の構造を含むアンサンブルであり、その鎖の立体配置エントロピー ($S = k_B \ln W$, ここで、 W は、微視的状态数を、 k_B はボルツマン定数を表す) は非常に大きい。したがって、($-ST$) は小さな値となる。

変性状態からタンパク質のフォールディングが進み N 状態に近づくにつれて、 H 曲線は、負の立体構造エネルギーを獲得するので徐々に減少する。

一方、フォールディングが進むにつれて、微視的状态数 W が減少し、鎖の立体配置エントロピー (S) はだんだん減少するため ($-ST$) 曲線は徐々に上昇していく。N 状態に近づくにつれてエントロピーは急激に減少する、つまり、($-ST$) 曲線は急激に増加する。

その結果、自由エネルギー曲線は上に凸となり、D 状態から N 状態への途中で極大となる。秩序度



が 1.0 である N 状態では、タンパク質の天然構造はほぼユニークに決まっている。 $W \approx 1$ であり、 $S = k_B \ln W \approx 0$ となるので、 $(-ST)$ 曲線も 0 に近づく。

したがって、 H 曲線と $(-ST)$ 曲線の和である自由エネルギー曲線 ($F = H + (-ST)$) は、図のように、D 状態と N 状態で極小点が存在することになる。(文献：V. Daggett and A. R. Fersht ; 「タンパク質フォールディングの遷移状態」(第7章), 『タンパク質のフォールディング』, 第2版, R. H. Pain 編, 河田・桑島訳, 丸善出版, 2000, 笹井理生著 ; 『蛋白質の柔らかなダイナミクス』, 培風館, 2008,)



アミノ酸残基を置換すると自由エネルギーが変化する！

Fersht らが提案した“ Φ 値解析”という手法の特徴は、“野生型タンパク質”のアミノ酸配列中の、ある部位のアミノ酸残基を、“組み換え DNA 技術”を用いて、他の残基に置換して新たな、“変異体タンパク質”を作成することにある。

この、ある部位のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換するという変化は、物理的観点からみると、野生型タンパク質に加えられた“摂動”とみなせる。元の系と“摂動”による新たな系を比較・検討することによって、元の系を理解する上で格好の情報が得られることが期待される。

上記のようなアミノ酸置換によって、自由エネルギープロファイルはどのように変化するのだろうか？

いま、右の模式図のように、特定の部位のアミノ酸残基を、例えばより小さなアミノ酸残基に置換することによって、置換前のアミノ酸残基との相互作用が消滅すると、構造エネルギー (H) が減少することになり、遷移状態が不安定になる。

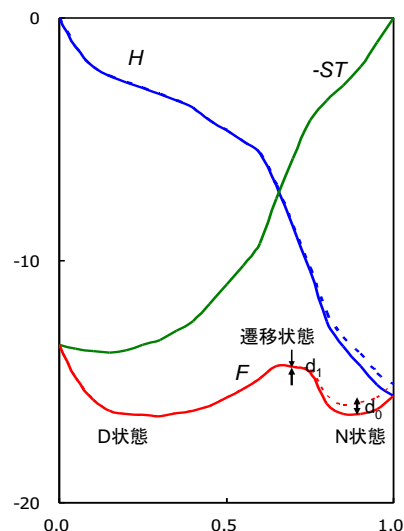
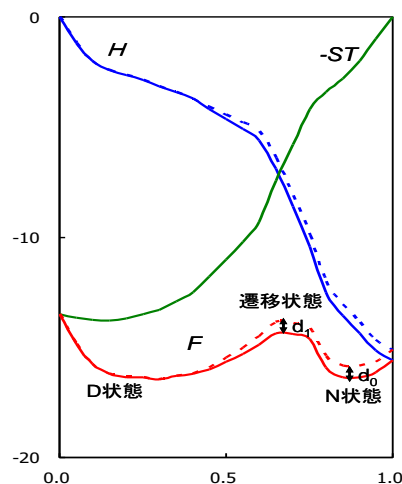
結果的に、遷移状態での自由エネルギーのピークが d_1 だけ上昇しタンパク質フォールディング・レート (反応速度) は、置換前の野生型タンパク質より遅くなる。ここで、アミノ酸置換によるエントロピーの影響は無視できるほど小さいとみなす。

もし、この置換によって天然状態が同じように不安定になって、天然状態での自由エネルギーのレベルが d_0 だけ上昇すると、次のような量が定義できる (Φ 値の定義)：

$$\Phi = \frac{d_1}{d_0}$$

ここで、 $d_0 = d_1$ つまり、 $\Phi = 1$ のとき (上図) は、遷移状態において、その部位を取り巻く空間的な環境が天然状態と同じであり、アミノ酸残基間相互作用も天然状態と同じ相互作用をしているとみなせる、つまり、遷移状態においてその部位は局所的に天然状態と同じ構造を形成していると推定できる。

一方、下の模式図のように、その部位でのアミノ酸置換によって天然状態が不安定になり天然状態での自由エネルギーのレベルが d_0 だけ上昇したにもかかわらず、フォールディングの反応速度が変化しない場合を考えよう：



$d_1 = 0$ ，つまり，遷移状態での自由エネルギーでの変化がない場合， $\Phi = 0$ となる。

結局，アミノ酸置換したその部位は，遷移状態では局所的に天然状態と同じ構造を形成しておらず，まだ大きく揺らいでいる，つまり，変性状態と同じ環境にあるといえる。

更に， $0 < \Phi < 1$ の場合，つまり，中間的な Φ 値のときは，その部位でのアミノ酸残基間相互作用が形成途中であるとみなせるであろう。



“ Φ 値解析法”による，タンパク質フォールディングの“遷移状態”の構造の推定

Φ 値は，タンパク質の特定のアミノ酸残基が，フォールディングの遷移状態で，どの程度天然状態と同じ構造を形成しているかを，0 から 1 の数値で示す指標であると見なせる．その理由は，すでに前節の“ Φ 値の定義”の項で述べているが，改めて詳細に確認しよう（略図参照）：

(a) $\Phi=1$ の場合

“野生型タンパク質”のアミノ酸配列の特定の部位のアミノ酸を，他のアミノ酸に置換したことにより，天然状態を不安定化させたでしょう。

つまり，天然状態での自由エネルギーが上昇する．一方，置換によって，“変異体タンパク質”のフォールディングの反応速度（ k_f^{mut} ）が，“野生型タンパク質”のフォールディングの反応速度（ k_f^{wild} ）より大になれば，遷移状態での自由エネルギーも上昇することになる。

このことは，置換によって削除された相互作用が遷移状態も不安定化していることになり，その相互作用は遷移状態においてすでに天然状態と同じ環境にある，つまり，このアミノ酸残基を含む部分構造は，天然状態での部分構造に似ていると推測される。

(b) $\Phi=0$ の場合

“野生型タンパク質”のアミノ酸配列の特定の部位のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したことにより，天然状態が不安定になったにもかかわらず，“変異体タンパク質”のフォールディングの反応速度（ k_f^{mut} ）は変化しないで，“野生型タンパク質”のフォールディングの反応速度（ k_f^{wild} ）と同じならば，遷移状態での相互作用は天然状態での相互作用と同じではなく，むしろ，ランダムコイル状態（変性状態）と同じ環境にあるとみなせる。

つまり，このアミノ酸残基が遷移状態でとる構造は，天然状態でとる構造ではなく変性状態のままであると推測される。

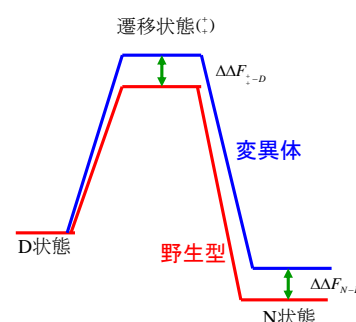
(c) $0 < \Phi < 1$ の場合

中間的な Φ 値をとる場合は，解釈するのが難しいが，次の二つの可能性が考えられる：

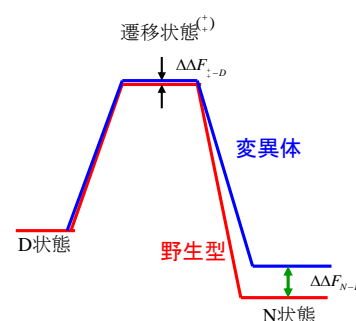
- (i) 相互作用が形成途中で，部分的にほどけた構造である場合
- (ii) 多様な遷移状態での平均的な構造をみていると考えられる場合

対象とするタンパク質に対して，そのアミノ酸残基の多くの部位でアミノ酸置換を行って，多くの変異体を作成し，その変異体毎の Φ 値を求め， Φ 値が大きいアミノ酸残基を調べることによって，フ

$$\phi \left(= \frac{\Delta\Delta F_{1 \rightarrow D}}{\Delta\Delta F_{N \rightarrow D}} \right) = 1 \text{ のとき}$$



$$\phi \left(= \frac{\Delta\Delta F_{1 \rightarrow D}}{\Delta\Delta F_{N \rightarrow D}} \right) = 0 \text{ のとき}$$



フォールディング遷移状態で天然構造と類似の構造を作る部位（“フォールディング核”）を推定することが可能である。

ここでは、“3次元格子タンパク質”に対して、統計力学モデルである“A-W_NILS モデル”を用いてΦ値を計算し、“3次元格子タンパク質フォールディングの遷移状態での構造”を推定しよう。

次章では、Φ値解析の方法を“実際のタンパク質”に適用してΦ値を理論的に計算し、その結果と、実験的に観測されたΦ値とを比較・検討して、“実際のタンパク質のフォールディング遷移状態での核形成部位”を推定しよう。

<文献> H. Wako and H. Abe, Study of Folding/Unfolding Kinetics of Lattice Proteins by Applying a Simple Statistical Mechanical Model for Protein Folding, in Protein Folding, E.C. Walters ED, pp. 349-376, 2011.

<文献> 安部 晴男, 山内 経則, 輪湖 博, “タンパク質フォールディングのキネティクス, III. Φ値解析によるフォールディング核の推定”, 西日本工業大学紀要, 第41巻, pp. 75-81, 2011.



フォールディング/アンフォールディング・レートとΦ値の関係

図は、“野生型の自由エネルギー曲線”（赤色）と“変異体の自由エネルギー曲線”（青色）を模式的に描いている。

いま、タンパク質の“フォールディングにおけるキネティクス”を考察しよう。

野生型において、“遷移状態 (‡) ”の自由エネルギーの値とD状態での自由エネルギーの値との差を ΔF_f^{wild+} とすると、“野生型タンパク質のフォールディング・レート k_f^{wild} ” は、次式で表される (k_0 ; 任意の定数, k_B ; Boltzmann 定数) :

$$k_f^{wild} = k_0 e^{-\Delta F_f^{wild+} / k_B T}$$

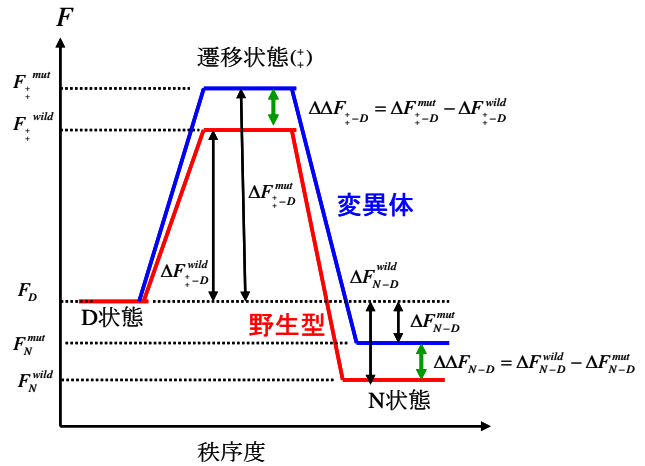
また、変異体において、“遷移状態 (‡) ”の自由エネルギーの値とD状態での自由エネルギーの値との差を ΔF_f^{mut+} とすると、“変異体タンパク質のフォールディング・レート k_f^{mut} ” は、次式で与えられる : $k_f^{mut} = k_0 e^{-\Delta F_f^{mut+} / k_B T}$

遷移状態での、“変異体タンパク質の自由エネルギーの値と野生型タンパク質の自由エネルギーの値との差 $\Delta\Delta F_{+D}$ ” は、次式のようになる :

$$\begin{aligned} \Delta\Delta F_{+D} &= \Delta F_f^{mut+} - \Delta F_f^{wild+} \\ &= -k_B T (\ln k_f^{mut} - \ln k_f^{wild}) \\ &= -k_B T \Delta \ln k_f \end{aligned}$$

(ただし, $\ln k_f^{mut} - \ln k_f^{wild} \equiv \Delta \ln k_f$ とおく)

次に、タンパク質の“アンフォールディングにおけるキネティクス”を考えよう。



野生型タンパク質において、遷移状態 (\ddagger) のでの“自由エネルギーの値と D 状態での自由エネルギーの値との差”を ΔF_u^{wild} とすると、“野生型タンパク質のフォールディング・レート k_u^{wild} ” は、次式で表される：

$$k_u^{wild} = k_0 e^{-\Delta F_u^{wild} / k_B T}$$

また、変異体タンパク質において、遷移状態 (\ddagger) での“自由エネルギーの値と D 状態での自由エネルギーの値との差を ΔF_u^{mut} ” とすると、“変異体タンパク質のフォールディング・レート k_u^{mut} ” は、次式で与えられる；

$$k_u^{mut} = k_0 e^{-\Delta F_u^{mut} / k_B T}$$

タンパク質のアンプォールディングにおいて、N 状態での“変異型の自由エネルギーの値と、野生型の自由エネルギーの値との差 $\Delta\Delta F_{N-D}$ ” は、次式のようになる：

$$\begin{aligned} \Delta\Delta F_{N-D} &= (\Delta F_u^{wild} + \Delta\Delta F_{\ddagger-D}) - \Delta F_u^{mut} \\ &= (\Delta F_u^{wild} - \Delta F_u^{mut}) + \Delta\Delta F_{\ddagger-D} \\ &= -k_B T ((\ln k_f^{mut} - \ln k_f^{wild}) - (\ln k_u^{mut} - \ln k_u^{wild})) \\ &= -k_B T (\Delta \ln k_f - \Delta \ln k_u) \end{aligned}$$

(ただし、 $\ln k_f^{mut} - \ln k_f^{wild} \equiv \Delta \ln k_f$, $\ln k_u^{mut} - \ln k_u^{wild} \equiv \Delta \ln k_u$ とおく)

故に、Φ 値は次のように表される；

$$\begin{aligned} \Phi &= \frac{\Delta\Delta F_{\ddagger-D}}{\Delta\Delta F_{N-D}} \\ &= \frac{\Delta \ln k_f}{\Delta \ln k_f - \Delta \ln k_u} \end{aligned}$$

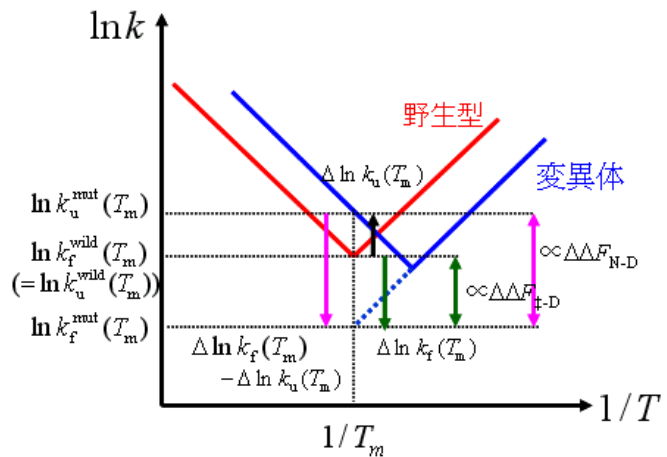


転移温度におけるΦ値の計算

図は、フォールディング・レート (k_f) とアンプォールディング・レート (k_u) の温度 (の逆数) 依存曲線 (シェブロン・プロット, Chevron plot) のイラストである。

転移温度 (T_m) においては、図に示しているように、次式が成立する；

$$\ln k_f^{wild}(T_m) = \ln k_u^{wild}(T_m)$$



故に,

$$\begin{aligned}\Delta\Delta F_{N-D} &= -k_B T_m ((\ln k_f^{mut}(T_m) - \ln k_f^{wild}(T_m)) - (\ln k_u^{mut}(T_m) - \ln k_u^{wild}(T_m))) \\ &= -k_B T_m (\ln k_f^{mut}(T_m) - \ln k_u^{mut}(T_m))\end{aligned}$$

さらに, $\Delta\Delta F_{\ddagger-D} = -k_B T_m \Delta \ln k_f(T_m)$

結局, 転移温度 (T_m) における Φ 値は次のように表される ;

$$\begin{aligned}\Phi &= \frac{\Delta\Delta F_{\ddagger-D}}{\Delta\Delta F_{N-D}} \\ &= \frac{\Delta \ln k_f(T_m)}{\ln k_f^{mut}(T_m) - \ln k_u^{mut}(T_m)} \quad \left(\text{ただし, } \Delta \ln k_f(T_m) = \ln k_f^{mut}(T_m) - \ln k_f^{wild}(T_m) \right)\end{aligned}$$

このように, 各アミノ酸残基での Φ 値は, 転移温度 (T_m) における, 次の 3 個の値から計算することができる (前ページのイラスト参照) :

$k_u^{mut}(T_m)$. . . 転移温度における, 変異体タンパク質のアンフォールディング・レート

$k_f^{wild}(T_m)$. . . 転移温度における, 野生型タンパク質のフォールディング・レート

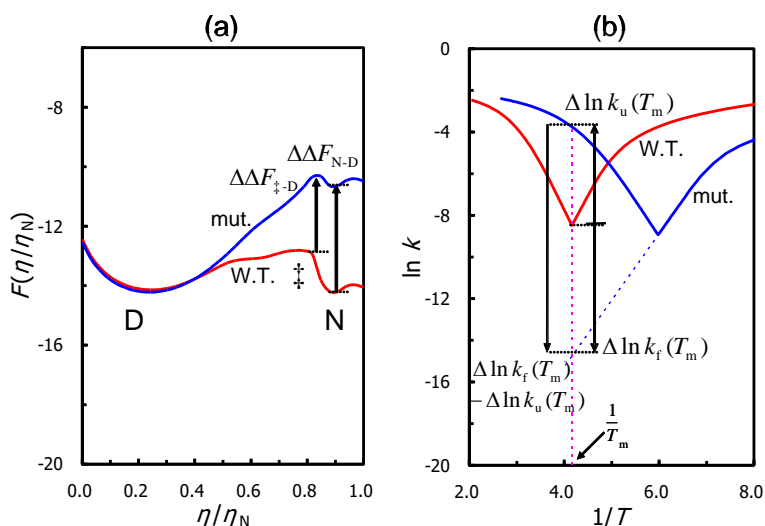
$k_f^{mut}(T_m)$. . . 転移温度における, 変異体タンパク質のフォールディング・レート



“Path through Snowfall”

図は、具体的な例として、3次元格子タンパク質 a1 の野生型 (wild type, W.T.) と、16番目のアミノ酸残基である Arginine を Methionine に置換した変異体 (mutant type, mut.) に対する、(a)自由エネルギー曲線と、(b)シェブロン・プロットを描いたものである。

ここで、D；変性状態， \ddagger ；遷移状態，N；天然状態， T_m ；転移温度 ($T_m = 0.240$)



“Φ値”より、3次元格子タンパク質値の“フォールディング核”の推定

図は、4個のタンパク質 (Protein a1, a2, b1, b2) それぞれに対して、 i -番目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場合の、アミノ酸残基 i の Φ_i 値 (平均値) を描いている。

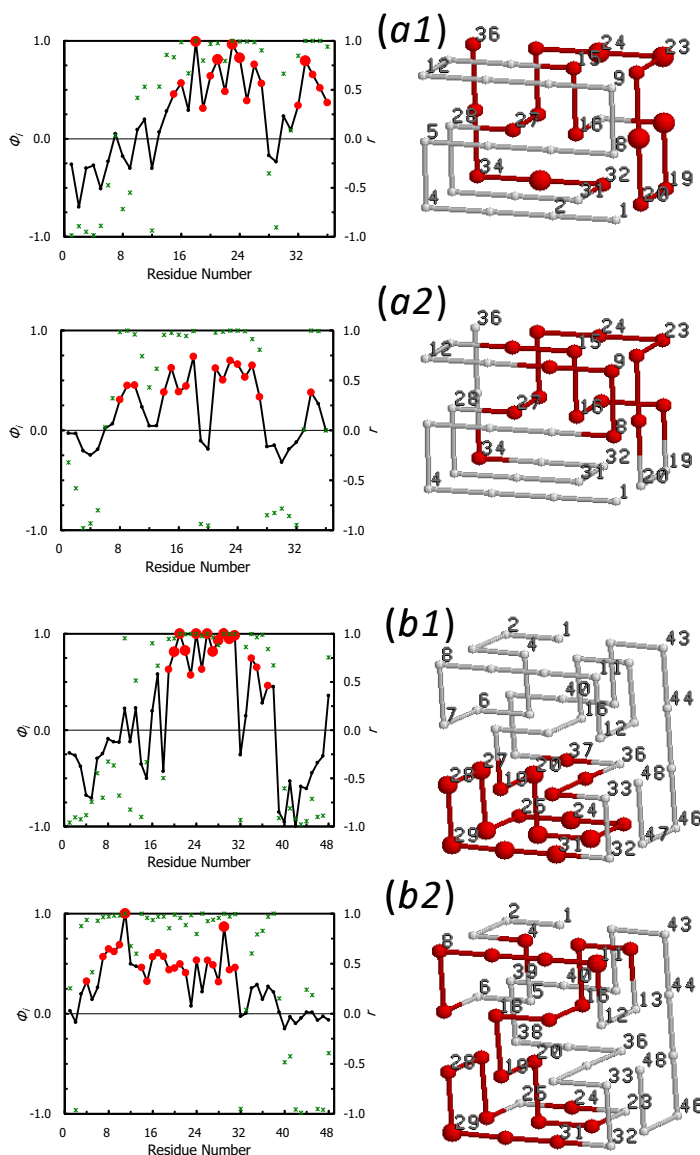
図の大きい赤丸は、 $\Phi_i \geq 0.8$ ，小さい赤丸は、 $0.3 \leq \Phi_i < 0.8$ ，に対応するアミノ酸残基を示している。

大きい赤丸に対応している残基は、遷移状態で、天然構造とほぼ類似の環境にあること、つまり、それらのアミノ酸残基は、遷移状態でほぼ天然構造と類似の構造を形成している確率が高いことを示している (フォールディング核とみなせる)。

Protein a1 (図の(a1)) では、“セグメント 15-27 と 31-36 の二つの領域”が、“フォールディング核”と推定される。

一方、Protein a2 (図の(a2)) でのフォールディング核としては、“セグメント 8-27 の領域”が推定される。

ここで、残基 19-20 でのΦ値は小さい。その理由として、遷移状態では、



残基 20 と残基 31 との長距離相互作用, 残基 19 と残基 32 との長距離相互作用が形成されていない為だとみなせる.

結局, タンパク質 Protein a2 の天然構造を考慮すると, この残基 19-20 も含めて, “セグメント 8-27 の領域” をフォールディング核と見なすことが妥当であろう.

タンパク質 *a1* と *a2* は, 同じ天然構造でもっているが, それぞれのアミノ酸配列が異なっている. 上記のことから, それぞれの遷移状態での構造は異なっている, つまり, フォールディング核も異なっていることがわかる.

詳細にみると, フォールディング核は, 一部のセグメント 15-27 は共通であるが, そこから, *a1* の方は, 共通のセグメントから C-末端へ延びていて Φ 値も大きく, これを中心にしてフォールドしているとみなせる.

一方, *a2* では, 共通のセグメントから N-末端へ延びていて, しかも Φ 値は, *a1* の場合の値と較べて小さく, 分散的であることがわかる. このことは, *a2* では, 一次配列上で離れた残基間の相互作用 (長距離相互作用) をたくさん準備し, これを主な駆動力としてフォールドしているとみなせる.

上記のことは, タンパク質 *b1* と *b2* の場合にも顕著に見られる.

b1 (図の(b1)) のフォールディング核は, “セグメント 19-37 の領域” と推定される. ここで, 残基 32-33 での Φ 値は小さい. その理由は, 残基 32 と残基 47, 及び, 残基 32 と残基 47 との長距離相互作用が遷移状態では形成されていないで, 最終段階で形成される為だとみなせる. しかしながら, 天然構造を考慮すると, この残基 32-33 もフォールディング核に含むことが妥当であろう.

一方, *b2* (図の(b2)) のフォールディング核は, “セグメント 4-31 の領域” と推定される. ここで, 残基 5-6, 12-13, 23, 25 での Φ 値は小さい. その理由は, 残基 5 と残基 40, 残基 6 と残基 39, 残基 12 と残基 33, 残基 13 と残基 44, 残基 23 と残基 46, 及び, 残基 25 と残基 38 との長距離相互作用が, 遷移状態では形成されていないで, 最終段階で形成される為だとみなせる. しかしながら, 天然構造を考慮すると, この残基 32-33 もフォールディング核に含むことが妥当であろう.

b1 の方は, Φ 値が大きく, フォールディング核を中心にしてフォールドし, *b2* の方は, Φ 値は *b1* の場合の値と較べて小さく, 分散的であり, *a2* の場合と同様に, 一次配列上で離れた残基間の相互作用 (長距離相互作用) をたくさん準備し, これを主な駆動力としてフォールドするとみなせるだろう.



“Lambs under Blossom Tree”



“Morning Light”