

Title	中性子散乱による蛋白質動力学の研究
Author(s)	片岡, 幹雄
Citation	大阪大学低温センターだより. 1998, 102, p. 8-14
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/8563">https://hdl.handle.net/11094/8563</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

# 中性子散乱による蛋白質動力学の研究

理学研究科 片岡 幹雄\* (内線5500)

E-mail:kataoka@ess.sci.osaka-u.ac.jp

## 1. はじめに

蛋白質は、生体における機能分子であり、遺伝情報の唯一かつ最終産物である。ありとあらゆる生命現象の素過程は化学反応であり、その反応を担う蛋白質が存在する。従って、蛋白質の理解は、生命の分子的基礎の解明にとって必要不可欠である。これまで蛋白質は物理学の研究対象として認められることはあまりなかった。しかし、蛋白質を物質としてみたときには、“20種類のアミノ酸が特定の配列によって重合した高分子”なのであり、その立体構造形成や機能発現の仕組みは、物理学の研究対象としてもおかしくはない。蛋白質を物理っぽく表現すれば、“多自由度複雑系”ということになる。多自由度複雑系に特異的な物性は何か、その物性が生理機能とどう関わっているか、という立場からの蛋白質研究を目指してもいいだろう、というのが筆者の最近のこだわりである。ということで、理想は遙か彼方にあるが、現実的にできることは限られてくる。ここでは、中性子準弾性・非弾性散乱を用いた蛋白質動力学についての最近の研究について紹介したい。

“蛋白質は巧妙な分子機械である”というのは、本学名誉教授の大沢文夫先生の言葉である。機械といえば、歯車やカムなどが複雑に組み合わされた硬い構造のイメージである。実際、一昔前までには、酵素（これもほとんどが蛋白質である）の基質認識について“鍵と鍵穴”という形の相補性による説明がなされていた。ところが、“蛋白質は柔らかい”のである。大沢先生は“分子機械の特徴はルースカップリング”と主張される。つまり、分子機械は入力と出力の関係がstoichiometricではなく、かといってstochasticでもない。この様な一見不合理なことを実現するのが、構造の柔らかさであろう。蛋白質は外界からの刺激に応答して構造を変えることができる。蛋白質による分子認識は“鍵と鍵穴”ではなく、“induced-fit”なのである。理論計算からは、この様な柔らかさ、すなわち蛋白質の動的性質こそが、蛋白質の機能発現にとって本質的なのだ、という指摘がなされている<sup>1)</sup>。私たちの研究グループでは、蛋白質は柔らかさを失うと機能しなくなることが実験的に示されている<sup>2)</sup>。蛋白質の動的性質、動力学を理解するためには、まずその動きを測らなければならない。この動力学の測定に威力を発揮するのが、中性子準弾性・非弾性散乱である。

## 2. 中性子非弾性散乱・準弾性散乱<sup>3)</sup>

散乱実験に用いる入射中性子のエネルギーは、熱エネルギーあるいは生体物質中の様々な振動モードのエネルギーと同程度である。従って、散乱の過程で、中性子は蛋白質にエネルギーを与えて特定の振動モードを励起する、或いは励起状態にある振動モードがエネルギーを中性子に渡して基底状態に戻る

\*現所属:奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 電話(0743)72-6100 E-mail:kataoka@ms.aist-nara.ac.jp

というように、蛋白質と中性子はエネルギーのやりとりをすることができる。散乱に伴うエネルギーの変化を測定する（中性子準弾性・非弾性散乱）ことで、蛋白質の動力学に関わる情報が得られることになる。図1に示すように、中性子散乱をエネルギー軸に沿ってみると、弾性散乱、準弾性散乱及び非弾性散乱の3つの領域に分類することができる。非弾性散乱は、蛋白質の振動モードとのエネルギーのやりとりの結果生じる振動スペクトルである。この領域のスペクトルは、基本的に蛋白質の基準振動解析

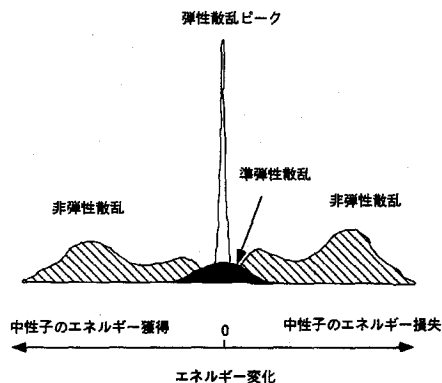


図1 中性子散乱で観測される三つの領域の模式図。

により説明される。準弾性散乱は、蛋白質の緩やかな運動或いは構造変化のような確率的な運動から生じる。弾性散乱は、時刻0の原子位置と、無限大の時間の後の原子位置の相関を表す。結晶のように原子が一定位置にとどまっていれば、弾性散乱は大きく準弾性散乱はほとんど観測されないが、一方液体のように、原子の位置が一定しない場合は、弾性散乱はほとんど観測されず準弾性散乱が大きくなる、という関係がある。また、弾性散乱強度の角度依存性からは、平均自乗変位すなわち振動やゆらぎの幅を決定することができる。

### 3. Staphylococcal nucleaseの中性子非弾性散乱スペクトルと基準振動解析<sup>4)</sup>

まず、中性子非弾性散乱を用いた蛋白質の動力学の測定の可能性を検証するために、広いエネルギー範囲で非弾性散乱スペクトルを観測した。試料に用いた蛋白質は黄色ブドウ球菌の産生する核酸分解酵素 (Staphylococcal nuclease (SNase)) で、その構造を図2に示す。SNaseは149アミノ酸からなる水溶性の球状タンパク質で、モデル蛋白質として物理化学的測定に良く用いられている。測定には、1 g

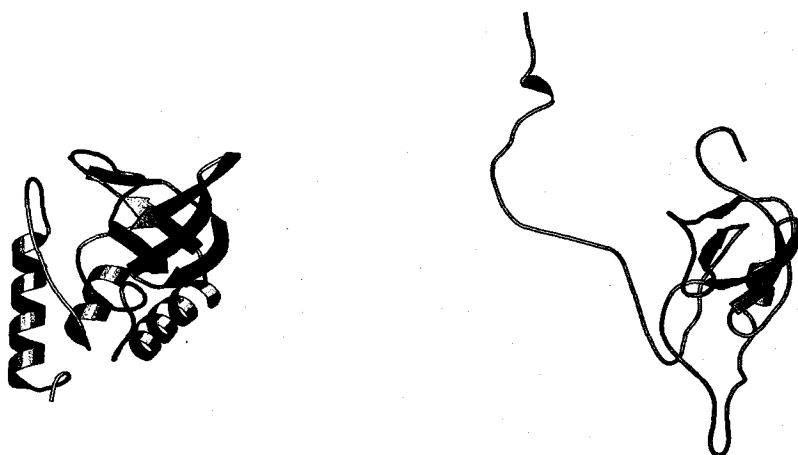


図2 Staphylococcal nuclease の立体構造。左は結晶構造解析に基づく折り畳まれた構造、右は分子動力学シミュレーションによって推測された変異体の構造。

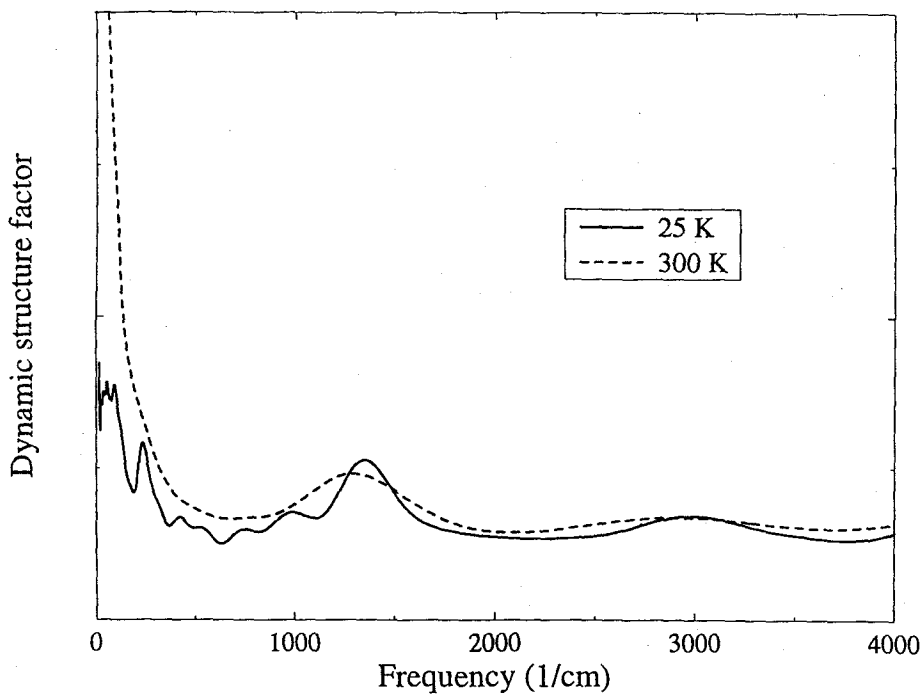


図3 室温及び25KでのSNaseの非弾性散乱スペクトル。見やすくするためにスムージングを行ってある。

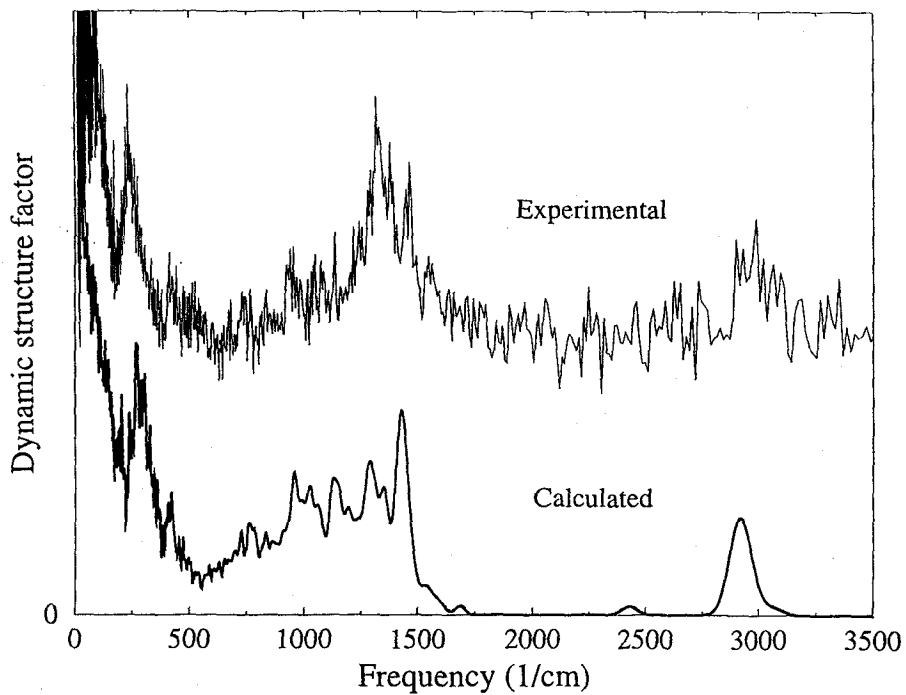


図4 中性子非弾性散乱スペクトルと基準振動解析計算との比較。実験値は図3のスムージングをする前のもの。

の凍結乾燥した粉末を用いた。通常の生化学の実験で用いる蛋白質量は高々10  $\mu\text{g}$ であることを考えると、いかに大量の試料が必要であるかがわかっていただけたらと思う。図3は、英国のラザフォード・アップルトン研究所の Pulsed Neutron Source に設置された TFXA という分光器で測定した蛋白質の室温及び25Kでの非弾性散乱スペクトルである。1gもの蛋白質を用いたことと、世界最強の中性子源を用いたことで、図3のスペクトルは、これまで蛋白質について報告されている中で、最も精度の良いスペクトルになった。低温でのスペクトルには微細構造が観測されるが、室温ではこうした微細構造は失われ、滑らかな曲線となっている。これは、Debye-Waller 因子によるものと考えられる。また、室温のスペクトルには、非調和性の影響も現れているであろう。

非弾性散乱スペクトルの詳細な解析には、理論計算の助けを借りる必要がある。ここでは、25Kのもとで、基準振動解析を行った。図4に実験で得られたスペクトルと基準振動解析の結果を示す。理論計算の結果には、実験で得られた装置の分解能関数がコンボリュートされているので、強度を含めて直接比較できる。図からわかるように、定性的には両者の一致は大変良い。この結果を用いて、各ピークのアサインができる。結果を表1にまとめた。表1に見るように、実験的に観測されたほとんど全てのピークを帰属することができた。しかし、ピークのアサインだけが目的なら中性子を使うメリットは特にない。図4の結果は、一方でまた、定量的な一致は必ずしも良くないことを示す。ピーク位置のシフトが見られるし、何より強度の不一致は著しい。ラマン散乱の強度計算には分極率の変化の情報が必要であり、赤外吸収の強度計算には遷移双極子モーメントの計算が必要であるが、これらは蛋白質のように複雑な構造について計算することは容易ではない。強度を含めて理論計算の結果と定量的比較のことが、中性子非弾性散乱のメリットの一つである。従って、強度の不一致によって来る原因を明らかにすることは重要である。

強度の不一致の原因をさらに探るために、スペクトルに対する水素原子の寄与及びHD交換の効果を調べてみた。実験試料は、重水溶液から凍結乾燥したものなので、表面に露出している解離性のHはDに交換している。中性子非弾性散乱スペクトルはほとんどが水素の非干渉性散乱によっている。SNaseについて、全原子を用いて計算してみたところ、非水素原子による寄与は極わずかであり、強度の不一致の原因ではないことがわかった。図5は、HD交換の効果を示している。Dに交換することで全体的に約20%強度が減少する。また、3300  $\text{cm}^{-1}$ に見られるNHストレッチバンドが2430  $\text{cm}^{-1}$ のNDストレッチバンドにシフトするなど、いくつかのピーク位置の変化も見られる。しかし、HD交換だけでは、強度の不一致は説明できないことも明らかであろう。理論計算に用いたポテンシャル関数は、実験のスペクトルを説明できるように調節していない。モデル有機化合物などから得られた一般的に良く用いられる値を用いている。図4の結果は、蛋白質では、こうしたポテンシャル関数を再評価する必要があることを示している。これまで理論計算の結果を実験的に検証する術がなかったのだが、今回の我々の結果により、蛋白質内でのポテンシャルの評価が初めて可能になったと言える。今後は、まずピーク位置が合うようにポテンシャル関数を求めなおし、基準振動解析を再実行した後、強度の比較を行う必要がある。

#### 4. 動力学から見た蛋白質の個性

蛋白質の機能は、蛋白質固有のものである。機能発現に動力学が重要であるなら、蛋白質の個性は動

Calculated spectra

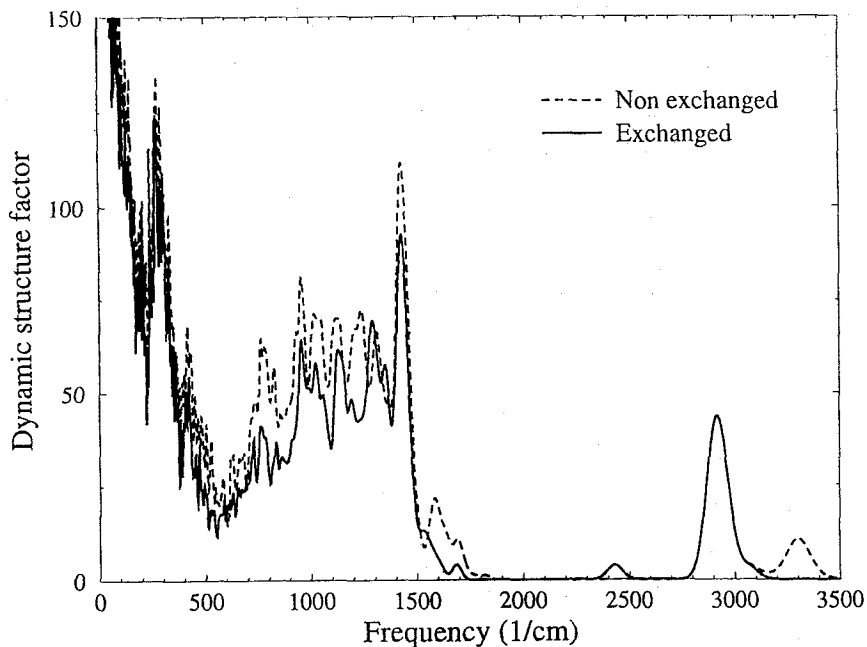


図5 基準振動解析へのHD交換の効果。

表1 実験で得られたピークの帰属

実験 ( $\text{cm}^{-1}$ )	理論 ( $\text{cm}^{-1}$ )	帰属
235	269	$\text{CH}_3$ -t
400-450	395-435	CCC-def, CCN-def, skeletal
477	471	CCC-def, CCN-def, skeletal
470-590		$\text{H}_2\text{O}$ (O-H $\cdots$ O)-b
720-775	720-795	$\text{CH}_2$ -r, CH-b
837	835	$\text{CH}_2$ -r
936	958	$\text{CH}_2$ -r, $\text{CH}_3$ -r
1136	1136	CH-b, $\text{CH}_2$ -tw, $\text{CH}_3$ -r
1284	1291	$\text{CH}_2$ -tw, $\text{CH}_2$ -w, CH-b, $\text{CH}_3$ -sb
1326		
	1352	$\text{CH}_2$ -w, $\text{CH}_2$ -tw, CH-b, $\text{CH}_3$ -sb
1386		
1455	1431	$\text{CH}_2$ -b, $\text{CH}_3$ -ab, CH-ip
1555	1530	C-N-s
	1680	C-N-s
	2430	N-D-s
2952	2920	C-H-s

添字は以下の運動を示す。

t = torsion, def = deformation, b = bend, r = rock, tw = twist,  
 w = wag, sb = symmetric bend, ab = antisymmetric bend,  
 ip = in-plane bend, s = stretch

力学にも現れるのではないか。さらに、単なるポリペプチドと、固有の構造に折り畳まれた蛋白質とでも動力学は異なるのではないだろうか。この様な素朴な疑問から、天然構造に折り畳まれたSNaseと生理的条件下では折り畳まれていないSNase変異体について中性子非弾性・準弾性散乱実験を行った。折り畳まれていない変異体の立体構造は、結晶構造解析やNMRなどで一意的に求めることができないが、結晶構造に基づいた分子動力学シミュレーションで推測された構造を参考のために、図2に示しておく。まず、3で述べた25Kでの高エネルギー領域の非弾性散乱スペクトルには際だった違いは見られなかった。表1に示したように、高エネルギー領域のスペクトルは主として共有結合に起因している。これらは、立体構造によらず共通であるから、高エネルギーの非弾性散乱スペクトルがよく似ていても不思議はない。エネルギー分解能をあげ、さらにQ依存性を丁寧に見なければ、差は検出できないだろうと思われる。

### Comparison of quasielastic scattering spectrum

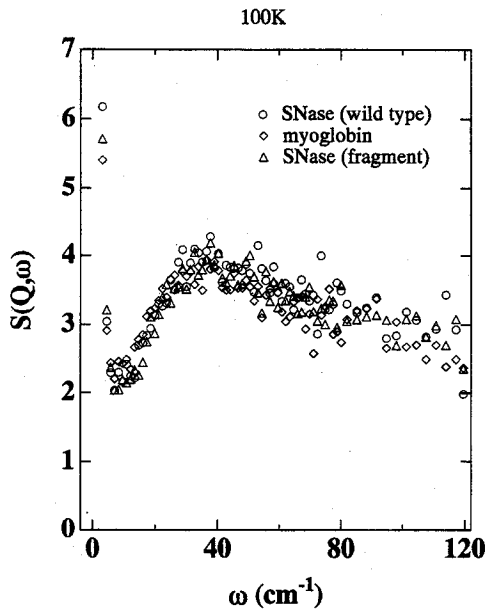


図6 100Kでの中性子非弾性散乱スペクトル。SNase(折り畳まれている、○)、SNase変異体(折り畳まれていない、△)及びミオグロビン(◇)のスペクトルの比較。

図6は、100Kでの比較的低エネルギー領域の非弾性散乱スペクトルである。このスペクトルは高エネルギー加速器研究機構のパルス中性子源に設置されたLAM40という分光器を用いて得られた。このエネルギー領域には、二次構造由来のモードが寄与している。理論計算からも、機能に重要と示唆される領域である。ところが、折り畳まれたSNaseも折り畳まれていないSNaseも、立体構造の違うミオグロビンも全く同じスペクトルを与えた。30cm<sup>-1</sup>付近に中心を持つブロードなピークは、ボソンピークあるいは低エネルギー励起と呼ばれているピークで、合成高分子やアモルファス物質あるいはガラスなどに共通してみられるものである。図6の結果は、低温での低エネルギーの振動的挙動には、蛋白質の

個性は現れない、ということを示している。平成10年3月5日から13日までの測定により、ポソソピークのピーク位置には分子量依存性がありそうだという結果が得られた。これまた、高分子やガラスなどと同様の結果である。

では、蛋白質という物質の特性はどこに現れてくるのだろうか。測定は今なお継続中であるが、室温しかも溶液状態の時に、低エネルギー領域の非弾性散乱及び準弾性散乱に明瞭な差が現れることが観測されている。低エネルギーの振動（いわゆるcollective mode）は折り畳まれることにより獲得され、準弾性散乱は折り畳まれていない方が顕著である。また、準弾性散乱の定量的解析から、蛋白質の非調和な運動は、いくつかの部位の間を飛び回る（jump）運動と、一つの部位の制限された領域内での拡散的な運動の組み合わせで説明できそうである。理論的には蛋白質の非調和な運動をあらわに取り入れたJumping Among Minima (JAM)モデルが提唱されている<sup>6)</sup>が、我々の測定結果は、この考えを支持しているように思える。今後、実験と理論のクロストークが楽しみである。

## 5. おわりに

我々の研究により、これまで理論主導であった蛋白質動力学の研究が、初めて実験的に検証されるようになった。しかし、今までの所、動力的には蛋白質であることの特性は見られない。興味深い様々な動力的な振る舞いは、合成高分子やガラスなどと変わるところはない。何故、自然は蛋白質を生理機能物質として選んだのか、無数に可能なアミノ酸配列の数の中から現存している配列が選ばれているのは何故か、蛋白質をめぐる様々な問題に物理学は答えることができるであろうか。私の目下の興味は“*What makes a protein protein? (何が蛋白質を蛋白質らしくしているのか?)*”を物理学の言葉で明らかにすることである。

## 参考文献

- 1) 妹尾康喜 “生物物理のフロンティア” (日本物理学会編) pp. 52-62, 培風館、東京 (1989)
- 2) 柚木順子 大阪大学大学院理学研究科宇宙地球科学専攻修士論文 (1998)
- 3) Bee, M. Quasielastic neutron scattering. Adam Hilger, Bristol (1988);  
Smith, J. Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Quart. Rev. Biophys.* 24, 227-291 (1991)
- 4) A. Goupil-Lamy, J. C. Smith, J. Yunoki, S. F. Parker & M. Kataoka. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 9268-9273 (1997)
- 5) A. Goupil-Lamy パリ第6大学博士論文 (1998)
- 6) 北尾彰朗 “タンパク質のかたちと物性” (中村春木、有坂文雄編) pp.177-189, 共立、東京 (1997)