

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：14301  
 研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）  
 研究期間：2008～2012  
 課題番号：20118004  
 研究課題名（和文） ATP 駆動蛋白質の機能発現における水の役割：統計力学理論解析  
 研究課題名（英文） Water roles in functioning of ATP-driven proteins: Analyses based on statistical mechanics  
 研究代表者  
 木下 正弘（KINOSHITA MASAHIRO）  
 京都大学・エネルギー理工学研究所・教授  
 研究者番号：90195339

研究成果の概要（和文）：シャペロニンの蛋白質折り畳みの援助，ABC トランスポーターの多剤排出， $F_1$ -ATPase 中の  $\gamma$ -サブユニットの一方方向回転，F-actin 上におけるミオシンの一方方向移動を例題とした統計力学理論解析を行い，「ATP とレセプターの結合，レセプター中における ATP の加水分解，ADP と Pi のレセプターからの解離」なるサイクルを繰り返しながら作動する ATP 駆動蛋白質の機能発現機構に対し，水を主役とした新しい横断的物理解像を構築した。

研究成果の概要（英文）：We have performed statistical-mechanical analyses on the assist to protein folding by chaperonin, multi-drug efflux by ABC transporter, unidirectional rotation of the  $\gamma$ -subunit in  $F_1$ -ATPase, and unidirectional movement of myosin along F-actin. We have constructed a novel, unified physical picture of the functioning of ATP-driven proteins which utilizes the binding of ATP to a receptor, ATP hydrolysis within the receptor, and release of ADP and Pi.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2012年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
総計	46,500,000	13,950,000	60,450,000

研究分野：理論生物物理学，液体の統計力学  
 科研費の分科・細目：数物系科学，数物科学

キーワード：ATP，蛋白質，水和，エントロピー，自己組織化，積分方程式論

1. 研究開始当初の背景

我々は、「生体分子が起こす種々の自己組織化過程の推進力が，系内に共存する水分子の並進移動の制限が緩和されることに起因する水の並進配置エントロピーの利得である」ことを示してきた。しばしば強調される荷電部位間の静電相互作用は，塩（生体系では 0.15M-NaCl）水溶液中では水分子およびカウンターイオン（特に後者）による遮蔽効果

により，桁違いに弱かつ短距離性になることに注意が必要である。自己組織化においては，生体分子-水分子間の水素結合の切断を生体分子内または生体分子間の水素結合で必ずしも補償できないため，エンタルピー変化はむしろ正になることが多い。蛋白質の折り畳みや変性のメカニズムは，一貫して水のエントロピー効果を軸にして説明可能である。我々は，ATP 駆動蛋白質の機能発現にも

この効果が主要な役割を果たしていると確信する。しかし、一般には蛋白質とATPの加水分解サイクルのみが注目され、水は脇役としてしか扱われない傾向が強い。「ATPとレセプターの結合、レセプター中におけるATPの加水分解、ADPとPiのレセプターからの解離」なるサイクルの役割についても、ほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の特徴は、「蛋白質-ATP-水分子集団を統合的にシステムとして捉えること、原子・分子レベルの情報に基づいた統計力学理論解析を主体とすること、水の並進配置エントロピーの効果を軸にすること」の3点にある。水、ATP、蛋白質が複雑に相関し合う結果として発現する生命現象に注目し、ATP駆動蛋白質の機能発現機構を横断的に解明する。「ATPとレセプターの結合、レセプター中におけるATPの加水分解、ADPとPiのレセプターからの解離」なるサイクルの役割について考察する。水を脇役としか見ていない従来の考え方を根本的に塗り替える。

## 3. 研究の方法

水の並進配置エントロピーの効果は、水を大きさを持つ粒子の集まりとしてモデル化しなければ考慮することができない。本研究では、次の2通りの方法を目的に応じて使い分ける。(2)は、我々が独自に開発した、蛋白質の複合体のような非常に大きな溶質をも非常に短い計算時間で扱える画期的な方法論である。

(1)水を単純流体としてモデル化し、蛋白質の複雑な多原子構造を陽に考慮した3次元積分方程式論。

(2)水に対して多極子モデルを採用(水分子間相互作用は、中心間距離および2分子の方向の多変数関数)し、蛋白質の複雑な多原子構造を4つの幾何学的指標(排除容積、露出表面の表面積・平均曲率の積分値・ガウス曲率の積分値)で代表させる「分子性流体用積分方程式論と形態熱力学的アプローチの統合型方法論」。

シャペロニンの蛋白質折り畳みの援助、ABCトランスポーターの多剤排出、 $F_1$ -ATPase中の $\gamma$ -サブユニットの一方方向回転、F-actin上におけるミオシンの一方方向移動を例題として取り上げる。必要に応じて、蛋白質の折り畳みや変性の問題、蛋白質間相互作用、疎水性水および親水性水和、蛋白質立体構造予測用の自由エネルギー関数の構築などの関連重要課題とも取り組む。

主な計算対象は、蛋白質あるいは蛋白質複合体の水和の熱力学量(特に、水和エントロピー)、蛋白質複合体(A)と蛋白質または溶質(B)の間の平均力のポテンシャル(Potential of Mean Force: PMF)である。PMFは、AとBが無限に離れている場合を基準とした、AとBがある相対位置にある場合の系(A、Bおよび溶媒で構成される)の自由エネルギーを表す。

## 4. 研究成果

(1)水の並進配置のエントロピーに主眼を置いた独自の統計熱力学理論(多極子モデルの水分子+分子性流体用積分方程式論+形態熱力学的アプローチ:3.の(2)で述べた統合型方法論)により、生体系における自己組織化の統一的理解が可能であることを示した。

①蛋白質の圧力変性・低温変性の分子機構を解明すると共に、「疎水性」の本当の物理起源を特定した。それは、水和エントロピーのうち、溶質-水分子の多体相関成分の排除容積項であり、従来から強調される溶質近傍における水の構造化からの寄与は相対的に遙かに小さい。

②蛋白質熱安定性の有力な指標(25°Cで計算した、折り畳みに伴う水のエントロピー利得)を提案した。4種類の相同チトクロムcの熱安定性の順番を射当てること、熱安定性に及ぼすヘムの役割を解明することに成功した。

③蛋白質立体構造予測用の有力な自由エネルギー関数を構築した。数百~数万通りの立体構造の中から天然構造を射当てるテストを133種類の蛋白質に対して実行し、世界最高の成績(的中率はほぼ100%)を収めた。

④蛋白質-蛋白質結合におけるホットスポット(結合自由エネルギーに支配的に効く蛋白質-蛋白質界面に存在するごく少数の残基)の理論的予測法を提案し、Bakerらが開発した有名な予測法Robettaを凌ぐ成績を収めた。

⑤X線結晶解析やNMR実験を通して得られた蛋白質天然構造モデルのキャラクタリゼーション法を提案した。各々の天然構造モデルの特徴や弱点を明らかにすることができ、より良い天然構造モデルを作成するための有用な指針が得られる。

(2)ミオシンヘッド(S1)のF-actin上における一方方向移動のメカニズムに対し、斬新な物理描像を提案した。

①水分子の並進移動に起因して、F-actin近傍のS1にエントロピーポテンシャル場が形

成されることを示した。

②S1 は、ATP や ADP+Pi と結合していない S1 に対して形成されるポテンシャル場 (図 1 上) と、ATP または ADP+Pi との結合によって幾何学的形状が変化した S1 に対して形成されるそれ (図 1 下) を行き来することによって、一方向移動を実現できることを論じた。

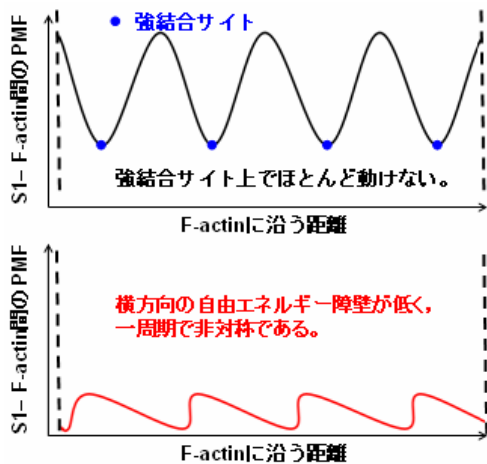


図1:S1がF-actin上で感じるポテンシャル

図 1 上では、S1 と F-actin の強結合サイトが水のエンタルピーの効果によって供給され、隣り合う 2 つの強結合サイト間距離は G-actin のサイズにはほぼ等しくなる。図 1 下では、横方向の自由エネルギー障壁が低く、一周期で非対称であるという特徴を持ち、S1 はバイアスのかかったブラウン運動的な挙動を示す。このとき、S1 は F-actin から離れ得るが、1 分子実験ではそれを阻止している。

(3) シャペロニン (GroEL) の機能発現機構

①水分子の並進移動に起因したエンタルピー力により、変性蛋白質がシャペロニン内キャビティーのほぼ中央部へ挿入されることを示した。

②蛋白質が折り畳むと、排除容積の減少によってエンタルピー力が弱まり、親水性の増大によってバルク水で水和されることを好むようになる (後者はエンタルピー成分の作用) : このようにして、挿入から放出への転換が起こることを示した。

③ナノメートルスケールの空間内における蛋白質の特異な水和特性がかぎになっており、サイクル全体を見渡すと、折り畳みに伴う蛋白質の特性の変化、ATP の結合・加水分解・分解生成物の解離によって調節されるシャペロニンの立体構造および内表面特性の変化、これら 2 つによる蛋白質とシャペロニン/コシャペロニン間の PMF の変化を巧みに利用して、シャペロニンは機能する。

④ABC トランスポーターでは、挿入時と放出時で溶質の特性は変わらないので、トランスポーターの立体構造および内表面特性の変化が、水の効果によって形成される「溶質とトランスポーター間の PMF」を調節しているものと考えられる。この変化は、ATP の結合・加水分解・分解生成物の解離というサイクルで制御されるわけである。

(4) TolC を想定した容器を対象とし、「多剤排出」の斬新な物理機構を提案した。

①ナノメートルスケールの空間内で拡散なる概念を適用する従来の考え方は誤りであり、水分子直径を周期としたポテンシャル場が容器内部に形成されることを示した (図 2)。

②溶媒の効果で溶質-容器間に形成される PMF をエンタルピー成分とエネルギー成分に分割すると、エンタルピー成分のみが、「溶質と溶媒の親和性および容器内表面と溶媒の親和性」にほとんど依存しないという特性を持つことが分かった。つまり、多剤性は、エンタルピー成分が支配的な条件下 (これは容器内表面が疎溶媒性でも親溶媒性でもない場合に該当するが) で溶媒の働きによって実現できることを意味する。

③容器の幾何学的形状を連続的に変化させることによる時間依存のエンタルピー力が、溶質の挿入/放出の鍵であることを論じた。

④疎水性・親水性を問わず、種々の大きさの溶質を挿入・放出できることを示した。

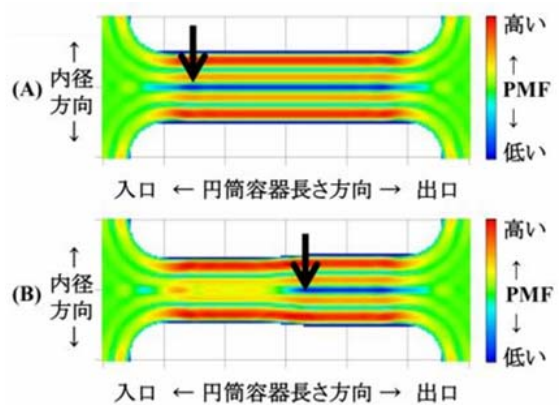


図2:(A)溶質はPMFが低い容器内へ挿入される。(B)容器の内径を入口側から狭めていくような連続的な変形によって初めて、溶質を出口側へと移動させ、容器外へと放出することができる(矢印:溶質の位置)。

(5) F<sub>1</sub>-ATPase の回転のメカニズムに対し、新しい物理描像を提案した。

①多くの蛋白質では、主鎖と側鎖が、全体的に 3 次元ジグソーパズルのように密に充填されている。しかし、アミノ酸配列によっては、

それは不可能である。そのような場合には、密に充填できる部分を優先的に密に充填する。要するに、全体的に平等に充填しようとすると、全体的にいいかげんになってしまい、かえって水のエントロピー的不利になるのである。このような充填構造の不均一性が  $F_1$ -ATPase にも見られ、これが  $\gamma$ -サブユニットの回転で利用されているというのが我々の考えである。

②水のエントロピー効果により、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体に充填度の異なる3通りの領域が常に形成され、それらのサイクリックな交換が $\gamma$ -サブユニットの回転を誘発することを論じた(図3)。

③Yeast  $F_1$ -ATPase に対する分子動学シミュレーションを実行し、統計力学理論解析で得られた物理描像の一側面の妥当性を検証した。

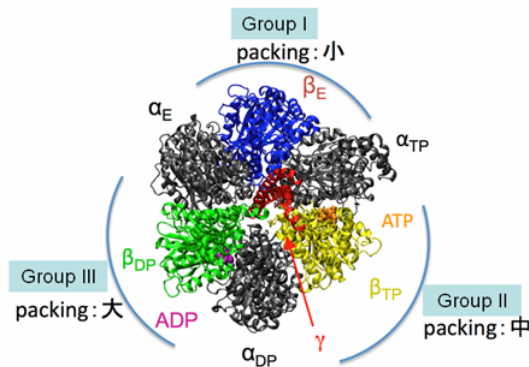


図3:  $\alpha_E$ ,  $\beta_{DP}$ ,  $\alpha_{DP}$  と特別な向きを持った  $\gamma$  の密な充填を局所的に優先させた場合に、水のエントロピーが最大になる。1サイクルで  $\beta_E$  は  $\beta_{TP}$ ,  $\beta_{DP}$  は  $\beta_E$ ,  $\beta_{TP}$  は  $\beta_{DP}$  に変化する。1サイクルで、 $\gamma$  は反時計回りに120度回転し、 $\alpha_E$ ,  $\beta_{DP}$ ,  $\alpha_{DP}$  との局所的に密な充填を取り戻す。

(6) 蛋白質の静的および動的性質に及ぼす糖の添加効果を明らかにした。

①水や糖水溶液の並進配置エントロピーに注目し、糖を加えると蛋白質の熱安定性が向上することを示した(図4)。

②ミオシン-F-actin 系の挙動に及ぼすショ糖の添加効果に関する実験結果(ATPとの結合に伴うミオシンのF-actinからの解離が、ショ糖の添加(1~2M)によって妨げられること)をも定性的説明可能であることを論じた。

③糖の添加は水のエントロピー効果や疎水性の強化に繋がる。横断的な物の見方をすれば、塩の添加によって希ガスの水中への溶解度が低下し、その添加効果がホフマイスター系列に従うこと；疎水的な蛋白質の熱安定性が塩の添加によって上昇すること；ショ糖の添加によってミオシンとアクチンフィラメントの親和性が増大することなどと物理要

因は同じであることを論じた。温度が低くなると、逆に水のエントロピー効果や疎水性は弱くなる。低温で自己組織化による構造形成力が弱まるのは、自己組織化に伴う水のエントロピー利得の生体分子-水間多体相関成分の排除容積項が顕著に小さくなるからである。

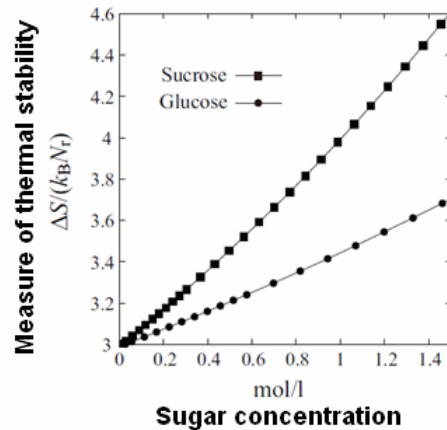


図4: 蛋白質の熱安定性の指標は、糖濃度の上昇と共に大きくなる(熱変性温度が高くなる)。この効果は、グルコースよりもサクロースの方が大きい。いずれも実験結果と一致する。

(7) ATP 駆動蛋白質の機能発現機構に対する新しい横断的描像を構築した。

①ATP 濃度が十分高く、ADP 濃度が十分低い条件下では、ATP との結合；ATP の加水分解；分解生成物 (Pi, ADP) の解離のうちのも (以下、これを ATP の作用と呼ぶ) がシステムの自由エネルギー低下に結び付く：つまり、自発的に起こる。これが1つの重要なポイントとなる。

②水が、ミオシン-F-actin, 蛋白質-シャペロニン, 溶質-トランスポーター,  $\alpha_3\beta_3-\gamma$  の各ペア間に PMF を形成することを示した。

③PMF は、ペアの立体構造と性質に強く依存して変化する；ATP の作用により、ペアの立体構造と性質が摂動を受け、PMF が変化することを論じた。

④以上のメカニズムにより、ミオシンの一方向移動、蛋白質や溶質の挿入/放出、 $\gamma$ -サブユニットの一方向回転などが起こる。ATP 加水分解自由エネルギー  $F_{ATP}$  分の低下が、上記のサイクルを駆動することを論じた

( $F_1$ -ATPase 中の  $\gamma$ -サブユニットの 120° 回転の場合、回転に伴ってシステムの自由エネルギーは図5のように変化する)。



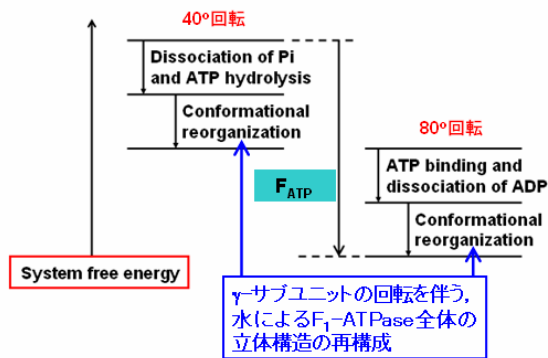


図5:  $\gamma$ -サブユニットの回転に伴うシステムの自由エネルギー変化

⑤以下のような議論ができる。蛋白質の折り畳みは自由エネルギーが低下するから自発的に起こる。しかし、ミオシン-F-actin, 蛋白質-シャペロニン,  $\alpha_3\beta_3$ 複合体- $\gamma$ -サブユニットの各ペアの状態は、ATPの作用がなければそのまま変化しない。ATPの作用のお蔭で、状態変化が起こるようになる。蛋白質の折り畳みではATPの加水分解サイクルは不要であるが、F-actin上におけるミオシンの一方向移動やF<sub>1</sub>-ATPase中における $\gamma$ -サブユニットの一方向回転では必要である。

⑥ATPの加水分解は、一旦結合したATPをADPとPiに分解して解離させる役目をしている。「水がATP駆動蛋白質の機能発現を掌る実行部隊であり、ATPは変化を起こすきっかけを作るスイッチング的な役割を果たしている」という見方ができる。

(8)今後の展望について要約する。自己組織化によって形成された秩序構造は、高圧をかけると崩れる。蛋白質の圧力変性、F-アクチンのモノマーへの解離、アミロイド繊維の崩壊などが該当する。また、低温では構造形成力が弱まる。蛋白質の低温変性、ミオシンとF-アクチンの結合力の低下などが該当する。これは、メタンの溶解度が約70°Cから温度を下げると高くなることや、非イオン性界面活性剤のミセルの平均サイズが約50°Cから温度を下げると小さくなることも密接に関連している。これらの現象は、種々の過程の横断的共通性の存在を物語っており、ある特定の因子が支配的に効くことを示唆している。この因子こそが、水の並進配置エントロピーの多体相関成分であり、その排除容積項が疎水性の本当の物理起源であるというのが我々の見解である。実は個々の水分子の存在も他の水分子にとっての排除容積を生成しており、この意味において水分子間にエントロピックな相関が生じる。溶質の自己組織化による水

分子間の相関の変化がまさに溶質-水間多体相関である。ここにあげた現象は、すべてこれを軸とした理論で説明することができる。

- 実験で観測された、apoPCの折り畳みに伴う大きなエントロピー利得の定量的再現
- 蛋白質の低温変性・圧力変性のメカニズム
- 蛋白質の熱安定性の指標の提案
- 蛋白質の熱安定性に及ぼす糖の添加効果
- 蛋白質立体構造予測に向けた自由エネルギー関数の開発
- NMR実験で得られた蛋白質天然構造モデルのキャラクターゼーション
- 蛋白質複合体におけるホットスポットの予測
- 分子認識のメカニズム
- アクチンフィラメントに沿ったミオシンの一方向移動
- シャペロニンによる蛋白質折り畳みの援助機能
- F<sub>1</sub>-ATPaseにおける $\gamma$ -サブユニットの一方向回転
- トランスポーターに見られる多剤排出のメカニズム

図6: 水のエントロピーを軸とした理論で我々が成功した課題。アンダーラインをほどこした課題は、エントロピー成分をも考慮しないと完全に失敗する課題。

水の並進配置エントロピー効果の溶質-水間の多体相関成分は、従来の生体系の研究では欠落していた物理因子である。水に対して分子モデルを採用してこの因子を的確に計算し、これを主因子として他の因子を加え合わせることにより、生体系における多くの問題（無論、この中にはATP駆動蛋白質の機能発現機構も含まれている）が統一的に理解できるのではないかと考えられる（図6参照）。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計47件）

- ①H. Mishima, H. Oshima, S. Yasuda, K. Amano, and M. Kinoshita, “Entropic Release of a Big Sphere from a Cylindrical Vessel”, Chem. Phys. Lett. **561-562**, 159-165 (2013). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.cpllett.2013.01.045
- ②木下正弘, 永山國昭, 「タンパク質水と理論の新機軸Ⅲ. 理論的考察」, 生物物理 **52**, 300-303 (2012). (査読有)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/6/52\\_300/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/6/52_300/_pdf)
- ③木下正弘, 永山國昭, 「タンパク質水と理論の新機軸Ⅱ. 新理論の応用展開」, 生物物理 **52**, 250-253 (2012). (査読有)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/5/52\\_250/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/5/52_250/_pdf)
- ④木下正弘, 永山國昭, 「タンパク質水と理論の新機軸Ⅰ. 朝倉-大沢理論を越えて」,

生物物理 **52**, 203-205 (2012). (査読有)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/4/52\\_203/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/52/4/52_203/_pdf)

- ⑤ T. Yoshidome and M. Kinoshita, “Physical Origin of Hydrophobicity Studied in terms of Cold Denaturation of Proteins: Comparison between Water and Simple Fluids”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 14554-14566 (2012). (査読有)  
DOI: 10.1039/c2cp41738c
- ⑥ T. Yoshidome, Y. Ito, N. Matubayasi, M. Ikeguchi, and M. Kinoshita, “Structural Characteristics of Yeast  $F_1$ -ATPase before and after 16-Degree Rotation of the  $\gamma$  Subunit: Theoretical Analysis Focused on the Water-Entropy Effect”, *J. Chem. Phys.* **137**, 035102(1-8) (2012). (査読有)  
DOI: 10.1063/1.4734298
- ⑦ K. Amano, H. Oshima, and M. Kinoshita, “Potential of Mean Force between a Large Solute and a Biomolecular Complex: A Model Analysis on Protein Flux through Chaperonin System”, *J. Chem. Phys.* **135**, 185101(1-14) (2011). (査読有)  
DOI: 10.1063/1.3657856
- ⑧ T. Yoshidome, Y. Ito, M. Ikeguchi, and M. Kinoshita, “Rotational Mechanism of  $F_1$ -ATPase: Crucial Importance of Water-Entropy Effect”, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4030-4039 (2011). (査読有)  
DOI: 10.1021/ja109594y
- ⑨ K. Amano, T. Yoshidome, M. Iwaki, M. Suzuki, and M. Kinoshita, “Entropic Potential Field Formed for a Linear-Motor Protein near a Filament: Statistical-Mechanical Analyses Using Simple Models”, *J. Chem. Phys.* **133**, 045103(1-11) (2010). (査読有)  
DOI: 10.1063/1.3462279

[学会発表] (計 98 件)

- ① 木下正弘, 「生命現象発現における水分子並進移動の役割」, 新世代研究所第 6 回合同研究会, 明治大学紫紺館, 2011 年 11 月 29 日.
- ② 木下正弘, 「分子認識などの生命現象における水の並進エントロピーの重要性」, 日本学術振興会回折構造生物第 169 委員会第 36 回研究会, ゆうぼうと, 東京都品川区, 2011 年 10 月 4 日.
- ③ M. Kinoshita, “Roles of Water and ATP in Functioning of ATP-Driven Proteins”,

The 7th Congress of the International Society for Theoretical Chemical Physics (ISTCP-VII), Waseda University, Tokyo, Japan, September 2-8, 2011.

- ④ 木下正弘, 「「疎水性」の本当の物理起源: その温度依存性を通しての考察」, 第 56 回低温生物工学会大会セミナー, 招待講演, いわて県民情報交流センター, 2011 年 7 月 7-8 日.
- ⑤ M. Kinoshita, “Importance of Translational Entropy of Water in Biological Self-Assembly”, International Symposium on Multi-Scale Dynamics of Protein Complex Formation and Function, Sanjo Conference Hall, The University of Tokyo, Japan, July 14-16, 2009.
- ⑥ 木下正弘, 「アクトミオシンのような大規模系に対応可能な計算法はあるか?」, 日本生物物理学会第 46 回年会シンポジウム「水を主役とした化学力学エネルギー変換論—ATP から運動へ—」, 福岡国際会議場, 2008 年 12 月 3-5 日.

[図書] (計 2 件)

- ① 木下正弘, 「表面の水和の統計力学理論」, 日本化学会・コロイドおよび界面化学部会 35 周年記念出版, 丸善, 「現代界面コロイド科学の事典—チャンプーから宇宙まで—」, 10 章 6 節, pp. 244-245, (2010).

[その他]

ホームページ

<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/centerbunya/kinoshita> (木下研究室—京都大学エネルギー理工学研究所)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下 正弘 (KINOSHITA MASAHIRO)  
京都大学・エネルギー理工学研究所・教授  
研究者番号: 90195339