

1 はじめに

尿素は、タンパク質の変性剤として広く使用されている。近年の実験および計算機シミュレーションに基づく研究では、尿素変性の原因は **van der Waals** 相互作用による直接相互作用メカニズムであるという見解が強く支持されている。[1, 3, 7, 11, 13] ここでいう直接メカニズムとは、タンパク質と尿素の相互作用が変性の原因であるという説明で、対して、間接メカニズムとは尿素添加によってタンパク質と水の相互作用が変化に変化が起き変性が生じるという説明である。この見解に立てば、尿素のアルキル基誘導体であるアルキル尿素は、尿素より強い変性剤であることが期待できる。実際にアルキル尿素の変性作用を実験的に調査した研究では、アルキル基が長いほど変性能が高いという結果を報告している。しかし、同じ研究でアルキル尿素が溶媒環境を変化させる間接メカニズムが作用していることも示唆されているように、アルキル尿素変性が尿素変性と同様に直接相互作用メカニズムに基づくかは明らかではなかった。[9]

著者たちの以前の研究では *cytochrome c* を対象に尿素の変性効果を調べた。[11, 13] 純水から尿素・水混合溶媒への移行に伴う溶質 – 溶媒相互作用エネルギー変化の静電相互作用成分・**van der Waals** 相互作用成分・排除体積効果と移行に伴う自由エネルギー変化の相関解析を行った。

本稿で紹介する研究 [12] では、尿素・アルキル尿素のタンパク質変性効果を、計算機シミュレーションを用いて系統的に調査した。様々な構造のタンパク質を純水中から尿素やアルキル尿素を共溶媒とする混合溶媒中への移行に伴う自由エネルギー変化を分子動力学シミュレーションと溶液理論を組み合わせて求めた。共溶媒として、尿素・メチル尿素・1,1-ジメチル尿素・イソプロピル尿素を採用した。移行自由エネルギー変化と移行に伴うタンパク質 – 溶媒間の相互作用エネルギー成分の変化の相関を計算し、変性の支配要因を追求した。

移行自由エネルギー変化は、純水中の溶媒和(水和)自由エネルギーと混合溶媒中の溶媒和自由エネルギーの差として計算した。自由エネルギー摂動法や熱力学積分法を用いた場合、溶媒分子を明示的に扱ってタンパク質全体の溶媒和自由エネルギーを計算するには、莫大な(ほとんど実現不可能な)計算資源を必要とする。計算の際に溶媒系と溶質系をつなぐ多数の中間状態を必要とするためである。本稿の研究ではエネルギー表示溶液理論(ER)を用いて、溶媒和自由エネルギーの計算を行った。[4, 5, 6] ER では、溶媒系と溶液系のシミュレーションのみで、溶質 – 溶媒相互作用エネルギーの分布関数に基づいて近似汎関数を用いて溶媒和自由エネルギーの評価を行う高効率の近似計算手法である。

2 方法

タンパク質を、純水中から尿素・メチル尿素(MU)・1,1-メチル尿素(DMU)・イソプロピル尿素(IPU)の4種の共溶媒と水の混合溶媒中へ移行したときにおけるエネルギー変化について解析を行った。対象のタンパク質には T4-Lysozyme を採用し、初期構造として PDB 構造(PDB code:1LYD)を用いた。水モデルには TIP3P を、タンパク質と共溶媒の力場には AMBER99SB を採用した。ただし、共溶媒の点電荷は RESP を用いて新たに計算した。

分子動力学シミュレーション(MD)は、GROMACS 5.0.7 [2, 8] を用いて、300K・1bar の定温・定圧アンサンブルで行った。全ての系において、総溶媒分子数を 20,000 とした。尿素, MU, DMU, IPU の各分子数は、1178, 1270, 1340, 1420 とした。この設定は、混合溶媒の濃度を 3.0 mol/l にすることに対応している。

本稿の研究では 2 段階の MD を行った。即ち、タンパク質の構造に自由度を与え、混合溶媒中で天然構造周辺から変性構造までの構造を採取するためのシミュレーションとタンパク質の構造を固定し、その構造のタンパク質を純水中と混合溶媒中でシミュレーションを行い、移行に伴う(自由)エネルギー変化を計算する

ためのシミュレーションである。

純水中および混合溶媒中の溶媒和自由エネルギーの計算には、ERMOD 3.1 [10] を用いた。移行自由エネルギー変化と移行自由エネルギー変化の支配因子の同定を目的として、移行自由エネルギー変化とタンパク質 – 溶媒間の相互作用エネルギー成分の変化の相関解析を行った。相互作用エネルギー成分として静電相互作用成分・van der Waals 相互作用成分・排除体積効果を検討した。排除体積効果成分は、溶質の挿入に伴う溶媒分子の除去に起因する自由エネルギーのペナルティである。ER の枠組みにおいては、溶媒和自由エネルギーを

$$\Delta\mu = \int d\epsilon \rho(\epsilon) + \int d\epsilon f(\epsilon) \quad (1)$$

という表式で計算する。ただし、 ϵ は溶質 – 溶媒間の相互作用エネルギー、 $\rho(\epsilon)$ は溶液系での ϵ の分布関数、 $f(\epsilon)$ は排除体積効果も含んだ溶媒分子の再配置の効果を表す。このとき排除体積効果 $\Delta\mu_{\text{excl}}$ は、ある値 ϵ^c 以上で積分したもとして評価できる。 ϵ^c は十分に大きく、 $\epsilon^c < \epsilon$ では溶液系では実質的に存在できなくなるように決める。本稿の研究では $\epsilon^c = 25$ kcal/mol を用いた。

3 結果

3.1 移行自由エネルギーの解析

溶質を純水から混合溶媒へ移行した際の自由エネルギーの変化を、移行自由エネルギー変化と呼び、 $(\Delta\mu^{\text{mix}} - \Delta\mu^{\text{wat}})$ と表記する。 $\Delta\mu^{\text{mix}}$ は、混合溶媒和自由エネルギーで、 $\Delta\mu^{\text{wat}}$ は水和自由エネルギーとする。タンパク質のある構造を \mathbf{X} とし、 \mathbf{X} の純水中での出現確率を $P^{\text{wat}}(\mathbf{X})$ とすると

$$-k_B T \log P^{\text{wat}}(\mathbf{X}) = E_{\text{intra}}(\mathbf{X}) + \Delta\mu^{\text{wat}}(\mathbf{X}) + C \quad (2)$$

とかける。ただし、 k_B は Boltzmann 定数、 T は温度、 E_{intra} はタンパク質の分子内エネルギー、 C は定数を表す。同様に、 \mathbf{X} の混合溶媒中での出現確率を $P^{\text{mix}}(\mathbf{X})$ とすると

$$-k_B T \log P^{\text{mix}}(\mathbf{X}) = E_{\text{intra}}(\mathbf{X}) + \Delta\mu^{\text{mix}}(\mathbf{X}) + C \quad (3)$$

とかける。式 (2) と式 (3) から

$$P^{\text{mix}}(\mathbf{X}) \propto P^{\text{wat}}(\mathbf{X}) \exp(-\beta(\Delta\mu^{\text{mix}}(\mathbf{X}) - \Delta\mu^{\text{wat}}(\mathbf{X}))) \quad (4)$$

が、各々の \mathbf{X} について成立する。ただし、 $\beta = 1/k_B T$ は逆温度である。式 (4) に従えば、共溶媒の添加によって、変性構造が安定化することと $(\Delta\mu^{\text{mix}}(\mathbf{X}) - \Delta\mu^{\text{wat}}(\mathbf{X}))$ が大きな負の値を持つ構造 \mathbf{X} の出現確率が增大することを表現している。この関係が実際に成立することを次の様にして確認した。

タンパク質に自由度を与えた MD によって採取した天然構造周辺から変性構造までの構造に対して移行自由エネルギー変化 $(\Delta\mu^{\text{mix}}(\mathbf{X}) - \Delta\mu^{\text{wat}}(\mathbf{X}))$ を計算した。 $(\Delta\mu^{\text{mix}}(\mathbf{X}) - \Delta\mu^{\text{wat}}(\mathbf{X}))$ と溶媒接触表面積の相関を図 1 に示す。大きな負の値を持つ $(\Delta\mu^{\text{mix}}(\mathbf{X}) - \Delta\mu^{\text{wat}}(\mathbf{X}))$ に対応する構造ほど溶媒接触表面積が大きく溶媒接触表面積をおおまかに変性の程度と考えれば、移行自由エネルギー変化を用いてタンパク質変性のメカニズムを議論することを正当化している。

3.2 直接メカニズムか、間接メカニズムか

移行自由エネルギー変化を共溶媒の寄与と水の寄与に分割し、アルキル尿素の変性効果は、直接メカニズムか間接メカニズムか議論する。混合溶媒での溶媒和自由エネルギーは、ER の枠組みにおいては、

$$\Delta\mu^{\text{mix}} = \Delta\mu_c^{\text{mix}} + \Delta\mu_w^{\text{mix}} \quad (5)$$

とかける。ただし、 $\Delta\mu_c^{\text{mix}}$ は共溶媒の寄与、 $\Delta\mu_w^{\text{mix}}$ は水の寄与である。式 (5) の右辺には、自己エネルギーの項も存在するが、定数であるため相関解析には影響しないので無視している。

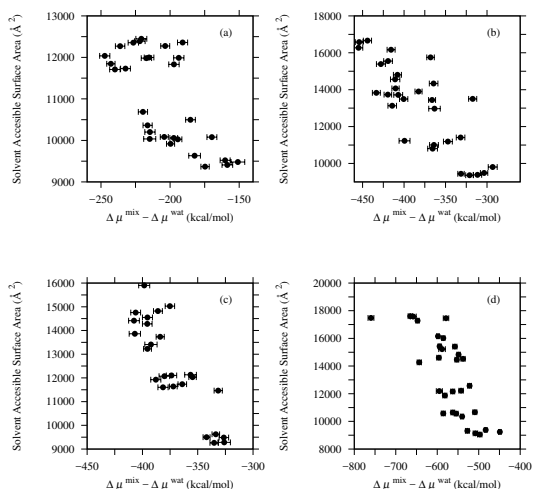


図1 溶媒接触表面積と移行自由エネルギーの相関。(a) 尿素-水混合溶媒中、(b) メチル尿素 (MU) -水混合溶媒中、(c) 1,1-ジメチル尿素 (DMU) -水混合溶媒中、(d) イソプロピル尿素 (IPU) -水混合溶媒中。

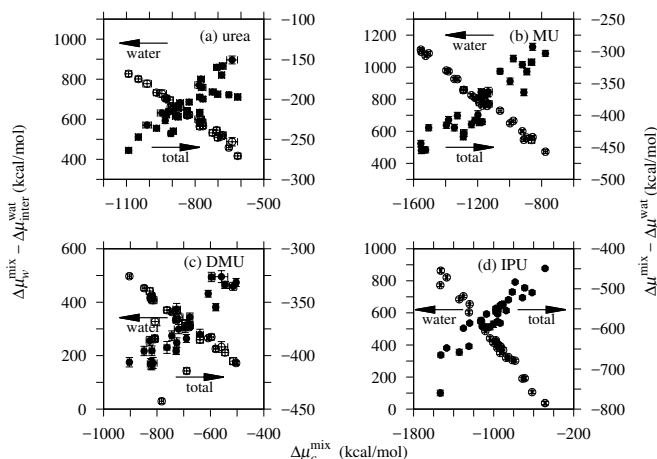


図2 間接効果 $\Delta\mu_c^{\text{mix}}$ と移行自由エネルギー ($\Delta\mu^{\text{mix}}(\text{X}) - \Delta\mu^{\text{wat}}(\text{X})$), 間接効果 $\Delta\mu_c^{\text{mix}}$ と直接効果 ($\Delta\mu_w^{\text{mix}} - \Delta\mu_w^{\text{wat}}$) の相関。(a) 尿素-水混合溶媒中、(b) メチル尿素-水混合溶媒中、(c) 1,1-ジメチル尿素-水混合溶媒中、(d) イソプロピル尿素-水混合溶媒中。

そこで、移行自由エネルギー変化は、

$$\Delta\mu^{\text{mix}} - \Delta\mu^{\text{wat}} = \Delta\mu_c^{\text{mix}} + (\Delta\mu_w^{\text{mix}} - \Delta\mu_w^{\text{wat}}) \quad (6)$$

とかける。式 (6) の第一項をタンパク質と共溶媒の相互作用に基づく直接効果、第二項をタンパク質と水の相互作用の変化に基づく間接効果とみなすことができる。図 2 に、4 種の混合溶媒中での直接効果と移行自由エネルギー変化、間接効果と移行自由エネルギー変化の相関を示す。尿素においてもアルキル尿素においても共溶媒の直接効果 $\Delta\mu_c^{\text{mix}}$ は常に負で、間接効果と逆相関の関係にあって、間接効果 ($\Delta\mu_w^{\text{mix}} - \Delta\mu_w^{\text{wat}}$) は常に正であった。また、直接効果 $\Delta\mu_c^{\text{mix}}$ と移行自由エネルギー変化は、正の相関をしていて共溶媒の寄与が変性構造の安定化に寄与していることが分かった。この結果は、アルキル尿素変性は尿素変性と同様に、共溶媒とタンパク質の相互作用に基づく直接メカニズムによるものであることを示している。

3.3 静電相互作用か, van der Waals 相互作用か, 排除体積効果か

次に, 静電相互作用, van der Waals 相互作用, 排除体積効果という溶媒 – 溶質相互作用成分の移行に伴う変化について, 移行自由エネルギー変化との相関解析の結果を議論する。

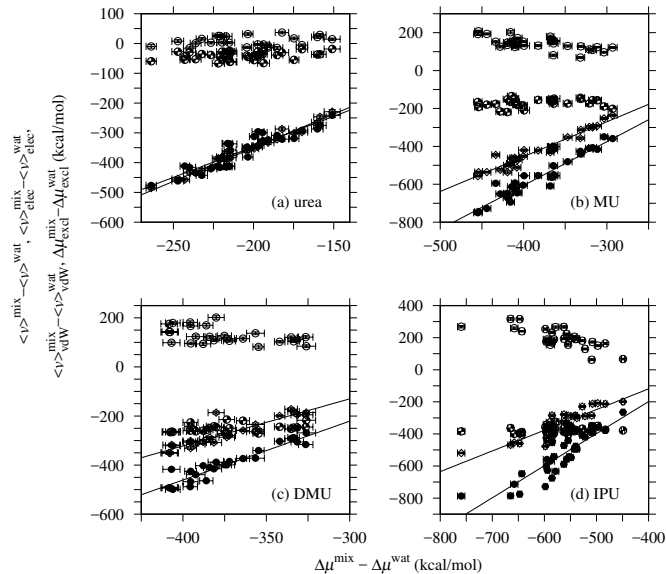


図3 移行自由エネルギー ($\Delta\mu^{\text{mix}}(\text{X}) - \Delta\mu^{\text{wat}}(\text{X})$) と溶質 – 溶媒間の相互作用エネルギー成分の相関。(a) 尿素 – 水混合溶媒中, (b) メチル尿素 (MU) – 水混合溶媒中, (c) 1,1-ジメチル尿素 (DMU) – 水混合溶媒中, (d) イソプロピル尿素 (IPU) – 水混合溶媒中。● – 全相互作用エネルギー, ○ – 静電相互作用エネルギー, ◇ – vdW 相互作用エネルギー, △ – 排除体積効果。

図3に, 4種の混合溶媒中での移行自由エネルギー変化と各相互作用成分の相関を示す。尿素 – 水の混合溶媒系においては, 移行自由エネルギー変化と溶質 – 溶媒間の相互作用エネルギー変化の van der Waals 成分の強い相関が発見できた。一方で, 静電相互作用成分・排除体積効果とは弱い相関しかなかった。よって, 3者のうちでは, van der Waals 成分が移行自由エネルギーの支配的な因子であるといえる。この結果は, cytochrome *c* の結果にもあてはまるものであった。アルキル尿素 – 水の混合溶媒系においては, 溶質 – 溶媒間の相互作用エネルギー変化の静電相互作用成分は, 正の値を持ち, かつ IPU の場合では移行自由エネルギー変化と逆相関の関係にあった。このことから, 尿素にアルキル基が伸びた場合は, 静電相互作用成分は変性構造 (溶媒接触表面積の大きな構造) の安定化を阻害していることがみえる。また, 移行自由エネルギー変化と van der Waals 成分との強い相関は, 尿素 – 水混合溶媒の場合と同様に MU, DMU, IPU でも存在した。静電相互作用成分による阻害は部分的なものであつて移行自由エネルギー変化の支配因子は依然として van der Waals 成分であるといえる。排除体積効果については, どのアルキル尿素が共溶媒の場合でも弱い相関しかなかった。

4 結論

本稿の研究では, T4-lysozyme を対象に純水中から尿素やアルキル尿素と水の混合溶媒への移行に関するエネルギー論的解析を行った。アルキル尿素としてメチル尿素・1,1-ジメチル尿素・イソプロピル尿素を用いた。分子動力学シミュレーションによって生成した天然構造周辺から変性構造までの構造にたいしてエネルギー表示溶液理論によって移行自由エネルギー変化を計算し, 移行自由エネルギー変化の支配因子を探索するための相関解析を行った。

その結果, 尿素・アルキル尿素ともに, 変性の支配因子は van der Waals 相互作用による直接相互作用メカニズムであることが見えた。この結果は, 尿素 – 水混合溶媒中の cytochrome *c* の結果と整合し, アルキ

ル基の伸長によって尿素を強い変性剤にできることを示唆している。

本研究は、東京大学情報基盤センター 2017 年度前期・後期若手・女性推進制度を通して使用したスーパーコンピュータ Oakeforest-PACS (JCAHPC) で実地した成果を含む。

参考文献

- [1] D. R. Cancchi and A. E. García. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, Vol. 64, p. 273, 2013.
- [2] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, and E. Lindahl. *J. Chem. Theory Comput.*, Vol. 4, p. 435, 2008.
- [3] T. Koishi, K. Yasuoka, S. Y. Willow, S. Fujikawa, and X. C. Zeng. *J. Chem. Theory Comput.*, Vol. 9, No. 6, p. 2540, 2013.
- [4] N. Matubayasi and M. Nakahara. *J. Chem. Phys.*, Vol. 113, p. 6070, 2000.
- [5] N. Matubayasi and M. Nakahara. *J. Chem. Phys.*, Vol. 117, p. 3605, 2002. *J. Chem. Phys.*, **118**, 2446 (2003) (erratum).
- [6] N. Matubayasi and M. Nakahara. *J. Chem. Phys.*, Vol. 119, p. 9686, 2003.
- [7] B. Moeser and D. Horinek. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 118, p. 107, 2014.
- [8] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, and E. Lindahl. *Bioinformatics*, Vol. 29, p. 845, 2013.
- [9] Y L A Rezus and H J Bakker. *J. Phys. Chem. A*, Vol. 112, pp. 2355–61, 2008.
- [10] S. Sakuraba and N. Matubayasi. *J. Comput. Chem.*, Vol. 35, p. 1592, 2014.
- [11] Y. Yamamori, R. Ishizuka, Y. Karino, S. Sakuraba, and N. Matubayasi. *J. Chem. Phys.*, Vol. 144, pp. 085102–1, 2016.
- [12] Y. Yamamori and N. Matubayasi. *J. Chem. Phys.*, Vol. 146, p. 225103, 2017.
- [13] 山守優, 松林伸幸. アンサンブル, Vol. 19, p. 88, 2017.