

生物物理学特論

— タンパク質立体構造の構築原理を中心として —

関西学院大学・理工学部

2024年2月

名誉教授 瀬川 新一

目次

はじめに: 生命の分子論的研究は如何にして始まったか

- (i) Delbrück の登場: Biophysics の誕生 i
- (ii) 「What is life ?」の出現: 多くの物理学者の興味を生命の謎に向かわせる ii
- (iii) ケンブリッジの構造学派 iii
- (iv) 遺伝物質の正体: 遺伝子は DNA という長い繊維状の高分子 iii
- (v) Pauling の化学結合論とポリペプチド鎖の α ラセン構造 iv
- (vi) 遺伝の謎を解くために DNA の構造決定は必要だったのか? v

第1章 生命という物質の誕生

§1 生物らしさとは

- 1) 立体構造の自己組織化 1
- 2) 代謝—化学反応回路網 2
- 3) 遺伝—自己複製 3
- 4) 進化—変異と淘汰 3

§2 物質進化の階層性と「生命の起源」—生命という物質の普遍性 4

§3 進化とは何か: Q_{β} フェージ RNA の試験管内進化実験

- 1) 発散的進化と収束的進化 5
- 2) 自己複製系の自然淘汰の理論—その基本方程式 6
- 3) Q_{β} フェージ RNA の試験管内増殖実験 8
- 4) 進化分子工学の出現 11
- 5) 原始生命系「what was life ?」: 自己増殖分子の起源 12

第2章 タンパク質立体構造とその構築原理

§4 タンパク質立体構造の基礎知識

- 1) ポリペプチド主鎖の構造 14
- 2) Ramachandran Plot 16
- 3) 20 種類のアミノ酸の側鎖の構造 17

§5 ポリペプチド鎖の2次構造

- 1) ヘリックス構造 17
- 2) シート構造 18
- 3) 折り返し構造 (β ターン) 19
- 4) 超2次構造 19

§6 タンパク質の立体構造 (3次構造)

- 1) 立体構造の類別 19
- 2) 4次構造の例 20
- 3) 類似の折りたたみ構造をしたタンパク質: 立体構造の構築単位 21

| | | |
|---------------------------|--|----|
| §7 | アミノ酸残基と2次構造への出現頻度 | 22 |
| §8 | タンパク質の内部と表面、立体構造の構築原理 | |
| | 1) 分子内部の原子充填密度 | 23 |
| | 2) タンパク質の露出表面 | 24 |
| | 3) タンパク質立体構造の構築原理 | 24 |
| 第3章 タンパク質の折りたたみ問題 | | |
| §9 | なぜタンパク質の折りたたみ問題なのか | |
| | 1) タンパク質の構造変化はNとUの2状態転移である | 25 |
| | 2) N-U転移(2状態転移)における協同性(cooperativity) | 28 |
| | 3) タンパク質の立体構造形成は3次元ジグソーパズル | 29 |
| §10 | タンパク質折りたたみ反応の計算機シミュレーション | |
| | 1) タンパク質の格子模型 | 30 |
| | 2) 特異的相互作用マップとタンパク質の島模型 | 31 |
| | 3) シミュレーションの結果 | |
| | (i) 島模型タンパク質の立体構造の揺らぎ | 32 |
| | (ii) 島模型タンパク質は3次元立体構造の違いをよく反映している | 33 |
| | (iii) 島模型タンパク質の自由エネルギー曲線 | 34 |
| | (iv) folding 反応経路と unfolding 反応経路 | 34 |
| | (v) folding-unfolding の反応速度定数の温度依存性と遷移状態仮説 | 36 |
| 第4章 折りたたみ反応の実験的研究—遷移状態の解明 | | |
| §11 | 折りたたみ反応の速度論的観測 | |
| | 1) 折りたたみ中間体としてのモルテングロビュールとは | 39 |
| | 2) 2状態転移なのに「折りたたみ反応経路」を問うことは可能か? | 40 |
| | 3) 反応素過程の定常流近似と遷移状態 | 40 |
| | 4) 折りたたみ反応の遷移状態仮説 | 42 |
| | 5) 遷移状態は折りたたみ反応経路のボトルネック | 43 |
| §12 | 反応速度定数のアレニウスプロット | |
| | 1) 遷移状態仮説による反応速度の解析: Dry Molten Globule とは | 43 |
| | 2) 部位特異的アミノ酸置換が折りたたみ反応速度に与える影響 | 45 |
| 第5章 タンパク質の構造とNMR分光法 | | |
| §13 | タンパク質NMRの基礎 | |
| | 1) タンパク質の構造とプロトンのスピン網 | 47 |
| | 2) プロトンNMRの基礎用語 | 48 |
| §14 | スピン角運動量ベクトルの運動 | |
| | 1) 核スピンの古典力学的歳差運動—ベクトル模型のBloch方程式 | 51 |
| | 2) Bloch方程式の量子論的解釈 | 51 |

| | |
|--|----|
| 3) NMR 現象を演算子形式の量子力学で考察する | |
| (i) 密度行列 $\hat{\rho}$ はスピンの量子状態を表す演算子 | 53 |
| (ii) Liouville-von Neumann の式 | 54 |
| (iii) スピンの運動を記述するハミルトニアン \hat{H} | 55 |
| (iv) 回転座標系への変換、 <i>rf</i> -パルス照射時のハミルトニアン | 55 |
| (v) 横磁化 (コヒーレンス) の自由歳差運動と FID 信号の観測 | 58 |
| 4) スピン結合した 2 スピン系の運動: スピン状態 \hat{I}_x と $\hat{I}_x\hat{S}_z$ の FID 信号 | |
| (i) スピン結合項を含むハミルトニアン | 59 |
| (ii) スピン結合項 $2\pi\hat{I}_z\hat{S}_z$ の下で \hat{I}_x, \hat{I}_y を t 時間展開する | 60 |
| (iii) 2 スピン系における in-phase SQ-coherence: \hat{I}_x の FID 信号 | 60 |
| (iv) anti-phase SQ-coherence: $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ の FID 信号 | 61 |
| 5) コヒーレンス移行: 異種核スピンエコーと同種核スピンエコー | |
| (i) 1 スピン系のスピンエコー | 62 |
| (ii) 2 スピン系のスピンエコー: 異種核、同種核スピンエコー | 62 |

第 6 章 多次元 NMR スペクトルとピーク帰属法

§15 多次元 NMR スペクトル

| | |
|--|----|
| 1) 2 次元 FID 信号: $f(t_1, t_2)$ を入手するための方法 | 64 |
| 2) HSQC スペクトルの測定原理 | 65 |
| 3) HSQC スペクトルの実例 | 67 |
| 4) COSY スペクトルと DQF-COSY スペクトル | 68 |
| 5) DQF-COSY スペクトルの実例 | 71 |
| 6) 2 次元 NOESY スペクトルの測定原理 | 73 |
| 7) 2 次元 NOESY スペクトルの実例 | 75 |

§16 ピーク帰属の実例: HSQC-NOESY-HSQC スペクトル

| | |
|------------------------------------|----|
| 1) 3 次元 HSQC-NOESY-HSQC スペクトルの測定原理 | 77 |
| 2) ピーク帰属の実例: SBD のピーク帰属 | 80 |

第 7 章 NMR 分光法でリゾチームの遷移状態の構造を探る

§17 リゾチームの遷移状態を原子レベルの分解能で解析する

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1) 秩序構造を部分的に失ったリゾチーム変異体の作製 | 87 |
| 2) リゾチームの短距離 NOE 相関と 2 次構造分布 | |
| (i) リゾチーム 4SS 体の短距離 NOE チャート | 88 |
| (ii) リゾチーム 3SS 変異体の 2 次構造の安定性 | 89 |
| 3) リゾチームの遠距離 NOE 接触マップ | 90 |
| (i) 4SS 体リゾチームの遠距離 NOE 接触マップ | 92 |
| (ii) 3SS 変異体の立体構造: 構造の一部が融解している | 94 |
| 4) リゾチーム分子の立体構造の動的揺らぎを観測する | |
| (i) タンパク質主鎖 NH プロトンの H/D 交換反応速度 | 95 |
| (ii) SS 結合欠損によって立体構造の揺らぎはどのような影響をうけるか | 97 |

| | |
|--|-----|
| 5) 折りたたみ反応の遷移状態の構造の詳細 | 98 |
| 6) リゾチーム 2SS 変異体は秩序-無秩序構造の分岐点 | |
| (i) 2SS[6-127,30-115]変異体だけがかろうじて立体構造を維持している | 99 |
| (ii) Cys76 と Cys94 は介在するペプチド鎖固有の構造的特性で近接する | 101 |
| (iii) 立体構造が崩壊する寸前の立体構造は 2SS[6-127, 30-115]変異体である | 102 |
| 7) 高濃度グリセロールは無秩序鎖のリゾチーム変異体に部分構造を誘導する | |
| (i) 2SS[6-127, 64-80]はグリセロール添加によって立体構造を再生する | 102 |
| (ii) グリセロール溶液中で残基毎の H/D 交換反応の PF 値を測定する | 105 |
| (iii) 選択的水和構造による 2SS[6-127, 64-80]の立体構造の再生 | 106 |
| (iv) 4 本の SS 結合の内、Cys6-Cys127 は特別に重要な意味をもっているのか | 106 |
| 補遺 生物は巨大分子構築物 | |
| Supplement : TMV の試験管内再構成実験 | |
| 1) タバコモザイクウイルスの形態形成 | 109 |
| (i) TMV コートタンパク質の会合体 (A. Klug らの実験) | 110 |
| (ii) RNA 上の再構成反応開始部位 | 111 |
| (iii) 再構成反応途中の TMV の電子顕微鏡像を観測する | 112 |
| 2) TMV の形態形成反応を原子座標の分解能で解明 | |
| (i) TMV コートタンパク質会合体の X 線構造解析 | 113 |
| (ii) TMV 形態形成反応の分子機構 | 113 |
| (iii) 自己組織化する超分子-ウイルス、細菌、細胞内小器官 | 114 |
| おわりに : | 116 |

はじめに：生命の分子論的研究は如何にして始まったか

現代の分子生物学のルーツは DNA という化学物質の発見とその物理的構造の解明によって始まった分子遺伝学である。19 世紀中頃に起きた近代原子論 (J. Dalton、A. Avogadro) によって物質は原子の構成物であるという概念が生まれ、原子や分子の物理的運動に基づいて、気体の熱的性質を解明しようという研究が始まったのが約 150 年前である (J.C. Maxwell、L. Boltzmann)。これが、物質の物理的性質を原子・分子論的に解明しようとする研究の始まりであった。しかし、1900 年頃には原子論的な物質像はまだ正当な評価を受けていない。その頃、原子の物理学に対する量子革命が起き、約 25 年後には量子力学が生まれ、化学結合論が確立した。その結果、広範な化学分子構造の解明が進展し、量子革命の約 50 年後には DNA やタンパク質の原子論的構造が明らかになり、生命も含めてすべての物質の行動原理が物理学にあるという信念を生み、非周期的な鎖状高分子が演じる物理現象が生命現象であるという考え方に至った。現代の分子生物学のルーツは近代原子論や量子革命にあると言ってもよい。

(i) Delbrück の登場：Biophysics の誕生

原子や分子の物理的性質を解き明かすことによって出現してきた量子革命の興奮がまだ続くなか、N. Bohr と E. Schrödinger という二人の物理学者は、「生命の謎」を量子革命の次の標的として考え始めた。彼らはその革命の成功者として問題提起を行ったが、実際に研究を始めたのは、Bohr のところで原子核の理論的研究を行っていた Max Delbrück という物理学者である。1932 年に Bohr が行った「光と生命」という講演に強く共鳴した彼は「生命の謎」を原子論的モデルに基づいて本格的に研究しようと考えた。天文学から原子物理学に転向し、さらに原子核物理学の理論家から遺伝学の分野に転向した彼は、生物の最も生物らしい現象が「遺伝」であると考えた。生物としての種々の複雑な要素を取り除いて、純粹に物質が演じる「自己複製という現象」をとり上げれば、物理学的な方法論で生命の謎を解明できると考えたからであろう。彼が研究を始めた 1930 年頃は、遺伝という現象を担う物質が何であるかも分かっていなかった。しかし、彼は生物を化学物質として究明するという方法をとらなかった。生命という物質の応答を現象論的に解析し、そのような応答を示す物理的実体を探ろうとしている。あくまで発想の原点は物理学にあって、原子の量子論的研究をモデルにしているように思われる。彼の研究は、古い歴史のある Biochemistry (生化学) という学問に対比して Biophysics (生物物理学) と呼ばれるようになった。

Delbrück はショウジョウバエの遺伝子変異の現象論的研究を始めたが、タバコモザイクウイルス (TMV) が結晶化することに強い興味を覚え、再結晶化した TMV が感染性を失わずに宿主細胞内で増殖する現象を知って、ウイルスの遺伝性を解明することが生命現象の本質に繋がると考えるようになった。ナチス・ドイツを避けてカリフォルニア工科大学に移った Delbrück はバクテリオ・ファージの研究と出会い、バクテリアウイルスの生物学的研究の基礎を学び、その増殖の分子過程を明らかにしようと研究を始めた。シンプルな仮説の提案とその実験的検証を繰り返すという手法は、量子力学が解明された当時の水素原子の研究に似ている。ファージという最もシンプルな物理系を用いることが「生命の物理学的究明」に通じるという信念を持っていたように思われる。ファージグループは、Delbrück と S. Luria を中心とし、その後、A. D. Hershey も加わってファージの分子遺伝の研究を開始したグループである。J.D. Watson は Luria の指導の下でまさにこのファージグループの出身者であった。ケンブリッジで DNA のらせん構造 (今後はラセンと表記する) の研究に苦闘していた間も、Delbrück と頻繁に手紙のやり取りをして、ライバルの L. Pauling の動向を探っている。

(ii) 「What is life ?」の出現：多くの物理学者の興味を生命の謎に向かわせる

1944 年に Schrödinger が発表した「What is life?」という著書の効果は絶大であった。量子革命の最大の功績者である著者が次の目標として「生命という物質の謎」をとりあげたことは著書の内容以上に大きな反響があったといえる。とりわけ、兵器開発に駆り出されていた若い科学者には希望の明かりとなった。生命とは原子核と電子からなる真空中に浮かぶ雲のような物質である。気体でもない、液体でも固体でもない。その系の振る舞いは複雑極まりなく、しかし、その秩序構造は熱によって乱れていくこともなく正確に安定に自己再生を続けている。さらに量子力学というキーワードも「生命の謎」を深める役割を果たしていた。化学物質としてだけでなく、生命を物理現象として考えるという見方は著名な物理学者の共感を呼び、若い研究者たちには物理として見て「生命とは何か」という魅力的な問いを發した。著者は遺伝情報の恒久的な安定性とそれに反する情報の多様性・流動性に注目し、非周期性結晶という物質の概念を生み出し、Heitler-London 力しか分かってなかった時代に、どのような原子間結合力が生命の永続的な秩序構造を維持するために重要な役割を果たしているのかという点に注目して考察して

いる。後に解明された 2 重らせんの DNA 鎖という遺伝物質は非周期性結晶という特性を持っており、また、いくつかのタンパク質分子の立体構造が明らかになると、その構造はまさに彼が指摘した非周期性結晶そのものであった。一意的な立体構造を保持して恒久的な安定性をもち、かつ柔軟な多様性も発揮できるというタンパク質の立体構造の特異性は今も重要な研究対象である。Schrödinger の時代に、遺伝子の複製機構を量子力学的に議論するには余りにも時期尚早であったが、X 線による物質の分子構造解析には機が熟していたとも言える。この本の中で遺伝子変異に対する Delbrück の量子力学的な研究が紹介され、生命の物理的研究に新天地があることを知らしめる結果となった。とりわけ、ケンブリッジの Cavendish 研究所には結晶構造解析学者が集まり、分子生物学の構造学派と呼ばれるようになる研究が始まった。これが「生物物理学」と呼ばれる研究の原点と言ってもよいだろう。

(iii) ケンブリッジの構造学派

Bragg 父子の伝統を受け継ぐ多くの結晶物理学者が X 線を用いて生物の構造解析の研究を始めた。その代表が、W.T. Astbury や J.D. Bernal である (Astbury は Molecular Biology という言葉を用い始めた人)。Bernal は鉱物の結晶物理学から、一気にタンパク質やウィルスの結晶構造学へと飛躍した。そこから、イギリスの構造学派が生まれ、M. Perutz や J. C. Kendrew (タンパク質)、M.H.F. Wilkins や R.E. Franklin (DNA) という結晶構造解析学者を輩出し、F.H.C. Crick や J.D. Watson もそこに集まってきた。ここから、タンパク質や DNA という生命現象の根幹に関わる巨大分子の構造解析が本格的に始まったのである。Delbrück を中心としたファージグループの情報学派と並んで分子生物学の構造学派と呼ばれている。

(iv) 遺伝物質の分子の正体：遺伝子は DNA という長い繊維状の高分子

Delbrück がウィルスの遺伝の研究を始めた頃は、タンパク質が遺伝子と考えられていた。しかし、1944 年に行われた O.T. Avery の肺炎双球菌の形質転換に関する実験から DNA が遺伝子であることが証明された。この発見は分子生物学の出発点となるような画期的なものである。その後も遺伝子に関する沢山の重要な研究が発表されたが、それらは分子遺伝学の問題としてよく知られているので、この講義の話題としては省略し、

Watson-Crick の 2 重らせん構造解明につながる知見だけとり上げることにしよう。1951 年ごろに、Hershey が行った T4 ファージの実験は、ファージの頭部にたたみこまれた DNA 分子だけが宿主細胞に侵入してファージの増殖がおきることを証明した。同じ頃、E. Chargaff は、沢山の生物試料から抽出した DNA の塩基の組成比を調べ、アデニン (A) とチミン (T) の量が常に同じであり、グアニン (G) とシトシン (C) にも同じ規則が成りたつことを見出した。生物種によって異なるのは、G:C と A:T の含有量の違いであり (塩基対という概念はまだない)、遺伝情報の違いがこの含有量の違いにあることを示唆している。以上の実験結果は、遺伝子の情報が DNA の塩基配列にあり、DNA 分子の複製が遺伝であることを示している。「自己複製反応の機構」を解明するためには、DNA 分子の物理的構造を知ることが不可欠だと誰もが考えるようになった。DNA の構造決定の話の前に、鎖状高分子の構造決定の先例としてポリペプチドの立体構造に関する Pauling の研究を考えてみよう。

(v) Pauling の化学結合論とポリペプチド鎖の α らせん構造

量子革命も終わりにさしかかった1920年代後半に研究を始めた L. Pauling は、量子力学を用いて化学結合の本質を明らかにする量子化学の分野で大きな成果を残した。分子内の原子間距離に関するデータを理論的に解明する研究から、炭素原子の電子軌道の混成によって分子の化学構造が説明できることを見出した。いわゆる SP^3 や SP^2 混成軌道である。Pauling がタンパク質や DNA の構造解析にとった方法はケンブリッジの構造学派のものとはかなり異なっている。Bernal や Perutz は Bragg 以来の結晶構造解析の正攻法を貫いて、逆フーリエ変換や Patterson 関数を用いた解析、位相問題の解決法などに取り組み、タンパク質というとても複雑な分子の構造解析に着実に迫っていた。R. Franklin はその正統的な後継者である。一方、Pauling は X 線回折法で構造を決定するにはタンパク質の構造は余りに複雑だと考え、ポリペプチド鎖の構成要素である低分子の構造を正確に求め、それを用いて高分子の構造を構築しようと考えた。すなわち、ペプチド結合に関わる原子の共有結合の「共鳴構造」を考慮して、その構造の平面性を発見し、それを基本として原子間距離や結合角などを正確に決め、それをもとにポリペプチド主鎖の立体構造のモデル構築を試みた。もう一つ重要な拠りどころは水素結合である。すべての残基が等価になるように構成ユニットをらせん状に並べ、鎖に沿って残基

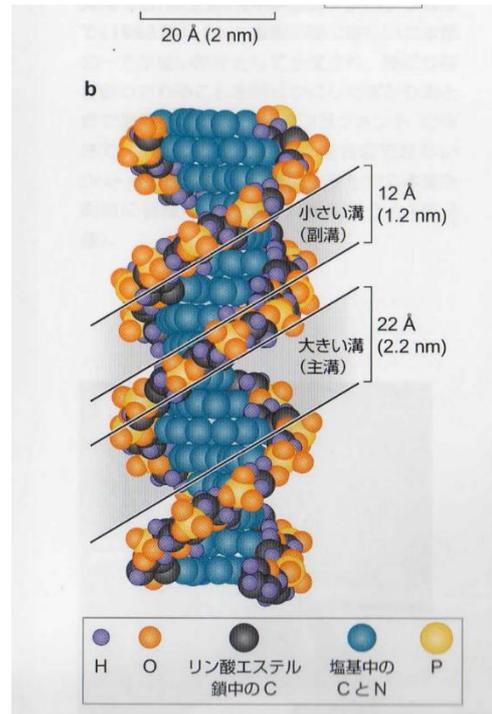
間の NH 基と C=O 基間に水素結合が架かるように C_α 原子の両端の回転角 (2 面角) を調整すると安定な規則構造が得られることを見出した。それが α ヘリックスと呼ばれるポリペプチド主鎖の規則構造である。その論文が発表されたのは 1950 年である。正攻法でタンパク質の構造を解明する研究の完成を目前にしていたケンブリッジの構造学派には大きな衝撃であった。Perutz や Kendrew はヘモグロビンやミオグロビンの立体構造の構築単位として α ヘリックスを認めることになった。その悔しさは DNA の構造解析においてもイギリス勢の焦りを招く結果となった。DNA に対する Pauling の研究に最も強い脅威を感じていたのは Watson と Crick である。

(vi) 遺伝の謎を解くために DNA の構造決定は必要だったのか？

1960 年代の終わりごろ、生物物理系の院生と生化学系の院生が集まると DNA の立体構造決定の意義について意見が分かれていた。DNA が担う遺伝現象にとっては塩基配列という情報が重要な意味を持つ。DNA の物理的構造の詳細な究明はそれほど重要度が高くないという意見が強く物理系は劣勢であった。否、物理学では現象を説明するための実体を厳密に想定する必要があり、物理科学に従ってその現象を考察する。塩基配列の図式的モデルでは真の信頼は得られないと反論した。

DNA の 2 重らせん構造発見の経緯は様々な本に紹介されているが、その内容は著者の主観によってかなり左右されている。本書の内容は Robert Olby が著した「二重らせんへの道<下>」(紀伊国屋書店) という本に基づいている。科学史上の豊富な資料を引用して最も客観的に書かれていると判断したからである。Wilkins と Franklin はロンドン大学・キングスカレッジの同じ研究室に居ながら、最初の研究協力のつまずきのため相互の会話もない状態になり、お互いに不幸な状態だったと思う。Franklin は DNA の繊維状態の湿度を慎重に制御し、B 型 DNA の見事な X 線回折像 (photo51) を撮ることに成功していたが、その構造解析は停滞し回折像のデータは門外不出の状態であった。彼女はモデル構築に頼らない純粋に結晶学的方法で構造解析することにこだわり、研究の進展は遅れていた。タンパク質の構造解析では Pauling に出し抜かれたこともあって、Bragg をはじめとするイギリス勢は焦っていた。特に、立体化学に基づくモデル構築によって DNA の構造解析を試みていた Watson と Crick は Franklin が撮った回折データを見ることも知ることもできなくて、Pauling に先を越される恐怖を強く感じていた。

その予感どおり、Pauling は 1952 年ごろ、ポリヌクレオチドのラセン構造に基づき、分子の密度計算の結果から、3.4Å 毎に 3 残基が充填されている必要があるというモデルを得て、内側にリン酸塩をもった 3 重ラセンという DNA 構造を導いていた。その報告を知った Watson は激しく落胆するが、生物学的機能の観点からその 3 重ラセン模型にはまだ違和感を持っていた。1952 年の末にケンブリッジの MRC（医学研究評議会）の会合で配布された研究報告書のコピーを Perutz から Crick が入手し、その中にあった Franklin の X 線回折データを詳しく検討した結果、彼は DNA の結晶構造に関する重要な知見を見出した。すなわち、2 重ラセンの DNA 鎖の骨格はラセンに垂直な軸の周りにも 2 回回転対称性が存在し、2 本の糖リン酸主鎖は一方は上向き他方は下向きに並んでいるはずだという発見である。これは DNA の 2 重ラセン構造を裏付ける決定的データとなったが、後年、Crick はその情報を Franklin の報告書のデータから得たと正直に述べている。



Watson はポリヌクレオチド鎖の反平行性を十分に理解していなかったようである。肝心の Franklin がどこまでその事実に気付いていたかどうかは定かでないとい Olby の本は証言している（そもそも Franklin はラセン構造に懐疑的であった）。Watson は塩基をいかにしてラセンの中央に納めるかということに腐心していた。そのとき、G と G、A と A の塩基対の間に水素結合が存在することを示す論文を見つけ、ピリミジンにも「似たもの同士」の水素結合対ができることを確認し、水素結合による塩基対形成が遺伝子複製の要であるというアイデアを得て Delbrück に手紙を送った。しかし、このモデルは Crick の逆平行 2 本鎖という模型に反している上、Chargaff の規則を満たす必然性もなく、2 種類の大きさの違う塩基対を 2 重ラセンの内部に組み込む困難さも伴っていた。さらに、このモデルが排除された決定的な理由は、塩基 (G,T,C) のケト-エノール互変異性に対して、Watson が選んだ構造異性体が間違っていたからである。しかし、その失敗が大発見を生むことになる。正しい構造式に書き直した塩基のモデルをいろいろ組

み合わせて配置しているうちに A と T は 2 本の水素結合で対を形成し、G と C は 3 本の水素結合でつながり、かつ A:T 対と G:C 対がほとんど同じ形をしていることに気付いた。2 種類の塩基対は大きさがほぼ同じなので、規則的なラセン構造の内部に組み込むのに非常に都合がよく、かつ自動的に Chargaff の規則を満足している。さらに、相補的な鎖が逆平行に並んでいるというモデルは鋳型による鎖の自己複製反応を見事に説明することができる。「似たもの同士」の水素結合による 2 重ラセン模型で起きていた矛盾は全て解消した。後の多くの人々がこの分子模型を「シンプルで美しい」と表現するが、繊維状の DNA 鎖の X 線回折像からそこにたどり着くまでの道程は決して平坦なものではなかった。この 2 重ラセンという物理的な立体構造が Delbrück 以来の「遺伝の謎」を一気に解いてしまったのである。

Franklin は不幸にも DNA の 2 重ラセン構造に対するノーベル賞選考委員会が開かれる 4 年前に 37 歳の若さで亡くなっていて、その受賞の栄誉を逃す結果となった。後年、Crick と Wilkins が書き残したものからは、受賞者に彼女が居なかったことへの配慮と一抹の「後ろめたさ」を感じることができる。Watson の著書で Franklin の人柄に対する扱いが余りにひどかったので、反動として Watson-Crick の 2 重ラセンは盗作ではないとか、共犯者として Wilkins だけでなく Perutz を名指しする著作まで現れた。歴史的な研究成果に対し、誰の貢献が最も大きかったかはノーベル賞委員会が決めるものではなく、最終的には歴史的評価が決めるものだと思う。しかし、歴史の評価もその時代の価値観に左右されるので絶対的なものではないだろう。

いずれにしても、Franklin は 3 人のノーベル賞受賞者に勝るとも劣らない業績を残した。キングスカレッジを去った後、彼女は一本鎖 RNA とタンパク質粒子の複合体である TMV の分子構造解析も成功させ、その研究の後継者である A. Klug はウィルスの自発的形態形成反応を原子レベルの分解能で最初に解明した人としてノーベル賞を受賞している。彼女は 2 つのノーベル賞級の研究を成功させた事になる。Franklin の短い研究人生は地味で孤独なものであったが、頑なまでに物理科学的で、生命の研究を本当に気体や固体の物理学と同じレベルにまで高めたと言えるだろう。

第1章 生命という物質の誕生

生物が原子・分子の構築物であると明確になった現在でも、それがどのようにしてこの地球上に現れてきたのかを考えるとその起源は明らかでない。物質の進化には階層性があり、元素の進化、分子の進化があり、そして生物の進化があるというのが現代科学の考え方である。分子の進化と生物の進化の間には境界線があるのだろうか。生命という分子システムが誕生し、化学物質と生命の境界線が生まれた。その境界線を引く「生物らしさ」とは何だろう。気体、液体、固体という物質とはどう違うか。平たく言えば、物質の状態が意のままに動的に変化するという事である。筋収縮による運動とまで言わなくても、巨大分子構築物の立体構造変化や、その自発的構造形成も生命という物質の動的状態変化である。その構造や機能は複雑多岐であるにもかかわらず精確に自己複製される。それを可能にしている原子間相互作用力はどのような特徴を有しているのだろうか。さらに、単なる自己再生にとどまらず新しい機能をもつ分子系を創出することもできる。そのような、物質としての生物の特徴をもう少し詳しく考察してみよう。

§1 生物らしさとは

生命とは巨大な分子構築物である。その構造は結晶の様な周期性を持たない極めて複雑なものであるが、精確に自己再生することが可能である。その物理的構造の構築過程に注目すると、構成分子自身が互いに相手を認識して自己組織化するという特徴を指摘することができる。生物活動という機能の面から考えると、代謝という化学反応の回路網を備え ATP というエネルギー通貨を生成し、それを消費して生命活動を維持する分子システムである。また、生物は自己複製反応機構を有し、「変異と淘汰」という現象を通し分子システムとしての価値を高めることができる。上記のような物質的特徴は全ての生物に対して共通であり、生命とは基本的にただ一つの物質なのである。

1) 立体構造の自己組織化

(i) 分子構築物の構成部品であるタンパク質の自発的折りたたみ

様々な生物機能を実現するため、多様なアミノ酸を連結したポリペプチド鎖が合成される。その鎖状高分子は決して合成されたままではなく、自発的に折りたたまってコンパクトな立体構造を形成する。巨大な分子構造を自在に変化させて、目的にかなう分子構築物を実現することのできる原子間相互作用力の特徴とはどのようなものだろう。構造変化の flexibility を優先すれば原子間結合力は強すぎてもいけない。弱い van der

Waals 力だけで立体構造の安定性を維持するためには、結晶のように原子が稠密にパックされた分子構造を要する。鎖状高分子の折りたたみ反応は部分構造を何度も修正しながら最終構造を探し当てるだろう。生命という物質の特性である動的状態変化の根源はこのような非周期性高分子の自発的構造変化にあると言ってよい。

(ii) 超分子の構造形成：ウィルスの形態形成も自己組織化反応である

TMV の形態形成反応は原子レベルの分解能で解明された。TMV が成長する様子の詳細は A. Klug によって解明されたが、想像以上に複雑な反応機構であった(補遺参照)。巨大で複雑な生体分子の構築過程は TMV の他にもいくつか解明されており、沢山の構成要素が互いに相手を識別しながら物理化学的な法則に従って自発的に自己組織化する物理現象であることが知られている。

2) 代謝—化学反応回路網

生物には代謝サイクルと呼ばれる化学反応の回路網が存在する。外界から取り込んだ化学物質(食物)を分解(消化)して、エネルギーを高エネルギー化合物に蓄える。その中で最も重要なものは ATP (Adenosine Triphosphate) という化学物質である。代謝サイクルを通してエネルギーを ATP に蓄え、必要ときにそれを加水分解してエネルギー

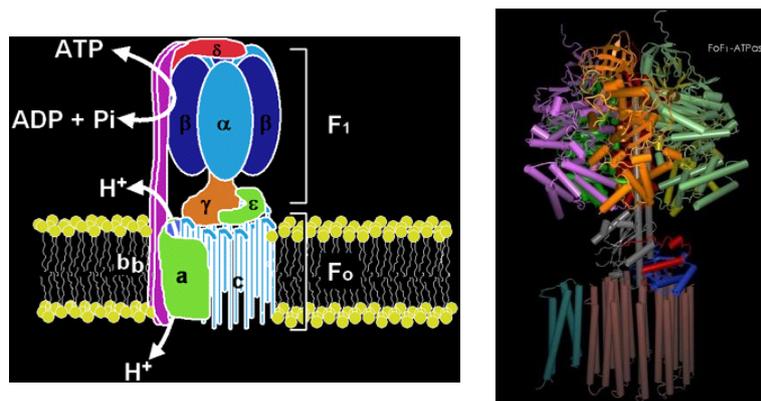


図 1-1 ATP 合成酵素の構造。左：分子の模式図、右：タンパク質構造。分子モータとも称され、膜中に埋もれた F₀ 部が H⁺濃度勾配によって回転すると、それに繋がった F₁ 部も回転して ATP を合成する。プロトン濃度勾配という電気化学的エネルギーを ATP というエネルギー通貨の合成に変換している。

ギーを取り出す。そのため ATP は生物のエネルギー通貨と呼ばれている。図 1-1 は、原子レベルの分解能で解明された ATP 合成酵素の立体構造を表している。代謝サイクルは酵素タンパク質によって触媒された高度に組織化された化学反応回路網であり、生命を構成している分子の動的状態を様々に変化させ、物質代謝を行って生物機能を維持している。そのような仕組みを持っていることが細胞レベルの生物の特徴である。すなわち、生体高分子の合成、その構造形成反応、膜の能動輸送、筋収縮、細胞運動など、ATP の化学エネルギーを消費して生物機能が維持されているのである。

3) 遺伝—自己複製

生物は自己複製のために自分自身が触媒として働く自己触媒反応系である。すなわち、2 重らせんの DNA という鋳型分子を用いて自己複製する能力を持つ分子システムである。その反応機構は分子遺伝として詳細に知られている。DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、tRNA、リボソーム (タンパク質と rRNA の複合巨大分子) などが関与する反応機構を通して、DNA 上の遺伝子情報を mRNA に転写し、それをタンパク質として発現して生命という分子システムの自己複製を可能にしている。それに関与する酵素タンパク質の立体構造はほとんど全て原子レベルの分解能で解明されている。

40 億年という長い時間にわたって、生命という物質が正確に自己再生を続けている。自己複製反応を実現する有機体が環境変化によって滅びたとしても、遺伝情報は生きている。化石のなかから採取された DNA の遺伝情報は、適切な発現系のもとでタンパク質として再生しうる。核酸に書き込まれた遺伝情報は 40 億年の間受け継がれてきた分子遺産であると言えるだろう。核酸の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列は化学物質であって生物とは言わないが、これらの化学物質が化学反応を通して有機的に連携して自己複製が可能になったものが生命である。単離・精製した構成分子を試験管中で再構成して、それを宿主細胞に戻すと生物としての感染性を示すという実験はウィルスレベルの実験では証明されている。しかし、それは細胞レベルの生命ではない。細胞レベルの生命を人工的に再構築することを目標とする研究は、その目的を社会に広く公開し、人類社会への影響を厳しく検討する必要があるだろう。

4) 進化—変異と淘汰

生命はただ単に自己複製を繰り返しているだけではない。常に新しい機能をもつ分子を創製し続けている。それは変異と淘汰という反応機構を通して実現されている。生

命とはそのような仕組みをもつ分子集団である。自己複製の過程で常にコピーミスによって変異体が生じる。この変異体を集団全体として温存し、変異によって生まれた不要物は増殖しすぎないように自然淘汰の圧力が働く。一方、環境変化に応じてごく僅かな確率で生じた有利な変異体により換えることによって、集団全体の進化を図る分子機構が働いている。それがどんな仕組みで機能しているかを以下で考えてみよう。淘汰とは競争原理の下で価値を選択するプロセスである。分子レベルでもその機能は生きている。分子進化とは生体分子が新しい分子機能を獲得するプロセスなのである。

さらに高度な生物機能として、分化、記憶、学習などをあげることが出来る。このような生物機能もまた生体分子が形成するネットワークの自己複製と淘汰という仕組みによって営まれている可能性がある。細胞分化も物質レベルの現象であることが明らかになってきた。ダーウィンの自然淘汰説は種の起源のみならず、生物全般の現象と深く関与しているのだろう。さらに、人類の文化、文明というものにも、遺伝子に対する自然淘汰の機構が機能して、高度な価値を獲得した社会が生まれてきたという考え方もある（R. Dawkins の利己遺伝子説）。教育という人間社会の仕組みは文化の自己再生のプロセスであるのかもしれない。

§2 物質進化の階層性と「生命の起源」－生命という物質の普遍性

複雑多岐にわたる種々の生物が生存する。しかし、分子論的に見れば生物はきわめて普遍的な分子の集団である。核酸、タンパク質という共通の分子素子を使っている点、遺伝コードや転写、翻訳機構の普遍性など、あらゆる生物は同じ分子機構の上に成り立っている。すなわち、ウイルスも大腸菌もヒトと同一の分子機械である。ゲノム解析の結果はヒトもハエも大腸菌も、ますますよく似た存在物であることを示している。すなわち、原始生命が存在したこと、そこからすべての生物が発散的に進化してきたことを明瞭に示唆している。

進化の階層性

宇宙の始まりに関する研究からは、最初にビッグバンが起き、物質や空間そして時間もそのとき始まったと考えられている。従って、最初の物質は数種類のクォークであり、その後、素粒子や原子が生まれてきた。それを「進化」と考えるなら、物質の進化には階層性があり、最初は素粒子の進化である。原子が生まれ、原子から次第に複雑な分子が生まれ、現在の生命の構成分子であるアミノ酸やヌクレオチドなどの有機化合物が生まれてきた。このような過程を「化学進化」とよんでいる。さらに高分子有機化合物が生まれ、それらを素材とした物質の自己組織化によって、自己複製を可能にする化学反

応系が生まれたと考えられている。それが生命である。すなわち、生命の起源とは「物質進化の最終章」である。

しかし、そのようなストーリーは現存する物質の痕跡を見て描いたものである。その痕跡は化学化石、生物化石として現認することは可能であるが、生命誕生の瞬間や分子進化のプロセスを見たものはいないし、それを再現する実験も不可能である。原始地球の状態を想定して、アミノ酸などの有機分子生成の実験を行ったものはいくつも報告されているが、その実験条件が果たして適正だったかという反論が必ず現れる。例えば、有名な「ミラーの放電実験」が行われた実験条件は原始大気環境と異なると考えられ、今や地球上の化学進化を裏付ける実験としては疑わしいと思われている。原始生命誕生の環境条件として、深海の海底火山であったとか粘土板が触媒になっていたとか、隕石が衝突したときのエネルギーがアミノ酸やヌクレオチドという有機分子を生成したという仮説は提案されているが、問題提起以上の実験的証拠は薄弱である。100年以上も前にアレニウスが提唱した「パンスペルミア説」を引用して、原始地球には多くの隕石が到来していたという痕跡から、宇宙のあるいは太陽系の惑星のどこかから原始生命となりうる有機分子が到来したという生命の起源説も存在している。しかし、それは原始生命誕生の舞台を、地球外のより未知な場所に移したに過ぎない。そこで、どのようにして、どんな自己複製系が生まれてきたのかには何も答えていない。

§3 進化とは何か：Q_βファージ RNA の試験管内進化実験

1) 発散的進化と収束的進化

現在地球上には数百万の生物種が存在する。これは一つの原始生命を起源として、数限りない自己複製と変異が繰り返され、それによって分岐した生物種の間でダーウィンの自然淘汰が行われた結果である。これを発散的進化と呼ぶ。一方、原始生命の誕生は、自己複製能をもつ多岐にわたる化学分子種間に起きた収束的進化の産物であるという考え方がある。「物質の自己組織化と生命の起源」という M. Eigen の論文における彼の主張である。以下で、この Eigen の考え方について考察してみよう。

原始大気中に生じた分子的混沌状態の中で、自己複製という機能を持つ分子が発生し自己増殖を競い合う中、分子集団の様々な種の間で自然淘汰が始まった。そのような自己組織化された分子種間に起きたダーウィンの自然淘汰の結果、原始生命系が選択され

たとえられる。Eigen はこれを収束的進化と呼んだ。原始生命を選択した自然淘汰は、それ以上の変異と淘汰を許さない恒久的な自然淘汰（Once forever selection）だったと考えられる。なぜなら、現存する生命は、他のものに置き換わることのない唯一の分子システムとして存在しているからである。それを可能とする自己複製系としてハイパーサイクル仮説が提案された。彼はこれを様々な自己複製分子種間のダーウィンの自然淘汰と想定し、自然淘汰の理論として数学的に定式化し厳密な解析を行った。さらにその後 Eigen は Q_{β} フェージの RNA を用いて自己複製分子の試験管内増殖実験を行い、その自然淘汰理論の実証実験を行った。この研究は進化分子工学という形でさらに研究領域を広げ、現在、様々な実験的研究が行われている。

2) 自己複製系の自然淘汰の理論—その基本方程式（興味のある人のための補遺）

自己複製系におきる変異と淘汰の現象を化学反応速度論の方程式にしたがって数学的に解析してみよう。以下の議論は Eigen の論文を紹介したものであるが、それを淘汰方程式と呼ぶ。まずその現象を解析するのに必要な変数を定義しよう。

(i) 分子は自己複製機能を持っている。情報を担う分子として RNA 鎖を想定する。

I_j : 情報担体分子、 x_j : 担体分子 I_j の濃度
 A_j : 自己複製速度、 Q_j : 複製精度、 D_j : 分解速度

(ii) 変異しなければ進化しない。

W_{jk} : 情報 I_k のコピーミスによって情報 I_j が生じる速度定数

(iii) 淘汰が起きるためには束縛条件が必要である。

全担体分子の量 x_0 が一定という束縛条件下で競争させる。 $\sum_k x_k \equiv x_0 = \text{一定}$ 、そのためには、 $\phi_j = \Phi_t \cdot (x_j/x_0)$ という流速で情報担体分子 I_j を取り除けばよい。

化学反応速度論の式は以下のようなになる。

$$\begin{aligned} \dot{x}_j &= A_j Q_j x_j - D_j x_j + \sum_{k \neq j} W_{jk} x_k - \phi_j ; \text{第3項は情報担体分子の変異、第4項は束縛条件を考慮} \\ 0 &= \sum_j \dot{x}_j = \sum_j (A_j Q_j - D_j) x_j + \sum_j \sum_{k \neq j} W_{jk} \cdot x_k - \sum_j \phi_j ; \text{全担体分子の量が一定という条件} \\ \therefore \Phi_t &= \sum_j \phi_j = \sum_j (A_j Q_j - D_j) x_j + \sum_j \sum_{k \neq j} W_{jk} \cdot x_k \\ \text{さらに、} \sum_{j \neq k} W_{jk} x_k &= A_k (1 - Q_k) x_k \text{ (分子種 } I_k \text{ のコピーミスによって生じる変異体分子の全量)} \\ \text{従って、} \sum_j \sum_{k \neq j} W_{jk} x_k &= \sum_k \sum_{j \neq k} W_{jk} x_k = \sum_k A_k (1 - Q_k) x_k = \sum_j A_j (1 - Q_j) x_j \text{ となる。} \\ \therefore \Phi_t &= \sum_j (A_j Q_j - D_j) x_j + \sum_j A_j (1 - Q_j) x_j = \sum_j (A_j - D_j) x_j \quad (1.1) \end{aligned}$$

つまり、過剰に生成された情報担体分子の量を Φ_t で取り除けば x_0 は一定に保てる。

ここで次の量を導入する： $W_{jj} = A_j Q_j - D_j$: 淘汰値 (selective value)

$$E_k = A_k - D_k : \text{過剰生成率、} \langle E \rangle \equiv \sum_k E_k (x_k/x_0) : \text{平均過剰生成率}$$

$$\Phi_t = \sum_j E_j x_j \text{ より、 } \phi_j = \Phi_t \cdot (x_j/x_0) = \left(\sum_k E_k x_k \right) x_j / x_0 = \sum_k E_k (x_k/x_0) x_j = \langle E \rangle x_j$$

この結果、自然淘汰の基本方程式は、

$$\dot{x}_j = (A_j Q_j - D_j) x_j + \sum_{k \neq j} W_{jk} x_k - \phi_j = (W_{jj} - \langle E \rangle) x_j + \sum_{k \neq j} W_{jk} x_k \quad (1.2)$$

いま、 $\sum_{k \neq j} W_{jk} x_k$ の項を無視すると上記の連立微分方程式は、

$$\dot{x}_j = (W_{jj} - \langle E \rangle) x_j \quad (1.3)$$

その結果、 $W_{jj} > \langle E \rangle$ となる情報 I_j のみが生き残る（淘汰値が平均値 $\langle E \rangle$ 以下の情報担体分子は消滅）。

その結果、時間 t の関数である平均過剰生成率 $\langle E \rangle$ が増大する。すると、ますます $W_{jj} > \langle E \rangle$ を満足する I_j が限定され、結局、 $\langle E \rangle$ が最大の淘汰値 W_{\max} に到達し、淘汰値が最大値をとる情報担体分子 I_m だけが生き残る。自然選択された分子種 I_m の淘汰値を W_{mm} と表すと、 $W_{\max} = W_{mm}$ となる。これが、自然淘汰の結果、唯一の情報担体分子（RNA 鎖）が選択されるという「収束的進化」である。

(iv) 擬種（Quasi Species）という概念： $\sum_{k \neq j} W_{jk} x_k$ の項を考慮して淘汰方程式を解く。

① 擬種間の生存競争によって自然淘汰が起きる。

式 (1.2) の $W_{jk} x_k$ という項を考慮に入れて、連立微分方程式を解く。行列 $\mathbf{W} = (W_{jk})$ を定義する。 \mathbf{W} の対角成分が W_{jj} である。従って、列ベクトル $\mathbf{x} = (x_i)$ を定義すると、式(1.2)は $\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{W} \cdot \mathbf{x} - \langle E \rangle \mathbf{x}$ と行列形式で表すことができる。 $y_j = \sum_k T_{jk} x_k$ と線型変換を行い、変換行列 $\mathbf{T} = (T_{jk})$ を導入し、 \mathbf{TWT}^{-1} が対角行列となるように $\mathbf{T} = (T_{jk})$ を選ぶ。 λ_j を行列 \mathbf{W} の固有値とすると、連立微分方程式は $\dot{y}_j = (\lambda_j - \langle E \rangle) y_j$ と表される。変数 $y_j = \sum_k T_{jk} x_k$ を擬種と名付ける。その説明は以下で行うとして、 $\lambda_j > \langle E \rangle$ を満たす擬種 y_j だけが生き残り、それが $\langle E \rangle$ を増大させ、最終的には $\langle E \rangle \rightarrow \lambda_{\max}$ に到達する。これが擬種の自然選択である。

擬種（Quasi-Species）とは

y_j を Quasi-Species（擬種）と呼ぶ。それは情報担体分子 I_j の分子濃度 x_j を線型結合したもので、情報担体分子の 1 つの集団を表す。行列 W_{jk} は非対角成分が対角成分に比べて極めて小さいので、一般に変換行列 T_{jk} ($k=1 \sim N$) も対角成分 T_{jj} がメジャーとなる。そのため、擬種は、ある情報担体分子 I_j をメジャー種として含んで次のように表される。 $y_j = T_{jj} x_j + \sum_{k \neq j} T_{jk} x_k$ 、つまり、 $I_k (k \neq j)$ という情報担体分子をマイナー種として含む分子集団である。情報担体分子の淘汰は擬種間の自然選択である。淘汰によって最終的に選択された擬種も、その集団はメジャーな情報担体分子 I_m （マスター鎖とよぶ）と、その情報が一部変異した分子をマイナー種として含んでいる。

② マスター鎖の安定性

淘汰平衡に到達すると、平均過剰生成率 $\langle E \rangle$ は最大値 $\lambda_m \approx W_{mm}$ （行列 W_{jk} の対角項の最大値）に到達する。淘汰された擬種内のマスター鎖は集団に内蔵する変異体より圧倒的に自己複製精度が高くないと分子集団としての情報を保持しえない。しかし、あまり複製精度が高すぎると自己の集団の中に変異が起これにくくなり集団としての進化速度が遅くなり進化にとっては不利になる。両方の要求を満たすためには、高分子の最適の重合度が存在する。詳細な議論は省くが、モノマー当たりの複製精度を q_m 、情報担体分子の重合度を v とすると、マスター鎖が擬種のなかでマスター鎖

でありうる最大重合度は、 $v_{\max} \approx 1/(1-q_m)$ である。例えば、 $q_m \approx 0.999$ とすれば、 $v_{\max} \approx 1000$ ということになる。重合度がこの値以上になると、自然淘汰されたマスター鎖はミスコピーのために遺伝情報を安定に維持できなくなる。一方、情報量を多くするために複製精度を高くしすぎると、変異と淘汰のサイクルが遅くなって進化のメカニズムが働かなくなる。

③ ハイパーサイクルの必然性

単独の自己再生系には保持できる情報量の上限がある。モノマーあたりの平均複製精度を $q_m = 999/1000$ のとき情報担体分子（例えば RNA）の最大重合度は 1000 ということになるが、これでは情報量が少なすぎる。情報量を多くするために複製精度を高くすると、変異と淘汰という進化のメカニズムが働かなくなる。その両方の要求を満足する自己複製系としてハイパーサイクルという仮説が Eigen によって提案された。ハイパーサイクルとは、構成要素のそれぞれが一つの閉じた自己複製サイクルであり、構成要素がさらに互いに共存関係を構築して閉じたハイパーサイクルの自己再生系である。Eigen の論文によると、ハイパーサイクルは以下のような特徴を示す。

1. サイクル内の自己複製系は互いに共存して、大量の情報量を貯えることができる。
2. サイクル内の各自己複製系の複製精度は閾値以下になっても、サイクル全体としての情報崩壊は起きない。そのため各自己複製系は頻繁に変異を起こすことができる。
3. ハイパーサイクルの増殖は爆発的に起きる：非線型現象として指数関数的増殖を示す。
4. その結果、自然選択されたハイパーサイクルは唯一の恒久的な自然淘汰となる。

3) Q_β ファージ RNA の試験管内増殖実験

(i) Spiegelman の実験系

1960 年代の後半、非常にシンプルな自己複製系が構築された。それはバクテリオファージ Q_β の RNA 鎖を用いた RNA の増殖実験である。試験管内でファージ RNA の自己増殖実験を行い、自己複製分子間の自然淘汰が起きることを検証する実験が可能となった。試験管内に存在する分子は以下のものである。

- ① 1 本鎖 RNA : バクテリオファージ Q_β の RNA 鎖 (約 4500 塩基長)。
- ② Q_β -RNA 複製酵素と核酸モノマー材料 (ヌクレオシド 3 リン酸 : NTP)

Spiegelman の植替え実験 (継代培養実験)

S. Spiegelman は、必要な分子が存在すれば細胞中でなくても鋳型分子の RNA 鎖は増殖できることを証明するために、試験管内で Q_β ファージ RNA の自己増殖実験を行った。 Q_β -RNA 複製酵素と核酸モノマー材料 (ATP, UTP, GTP, CTP) の入った試験管に Q_β ファージの RNA を加え、これを最初の鋳型 RNA (+鎖) として RNA のマイナス鎖を合成し、それを鋳型として元のプラス鎖を合成する。この自己触媒反応サイクルを回すことによって RNA 分子の自己複製反応が行われる。その結果 RNA が一定量増殖する

と、モノマー材料が不足してくるため次の新しい試験管に RNA 鎖を植え替えると、それが鋳型分子となって第 2 世代の RNA の試験管内自己増殖が始まる (図 1-2)。Q β -RNA 複製酵素の複製精度が不十分なため、複製反応中にしばしば変異が起き、環境条件に適した変異体が優位に増殖する。はじめの数世代はファージとしての感染性を保持していたが短時間でそれは失われ、74 世代後には約 550 塩基長に短縮された RNA になっていた。つまり、試験管内の自己増殖実験では RNA 鎖の情報は保存されずに、もとのファージの遺伝情報とは全く異なるものに変化していた。しかし、Spiegelman は、この実験結果が自己複製分子の一種の自然淘汰であることに気付いた。

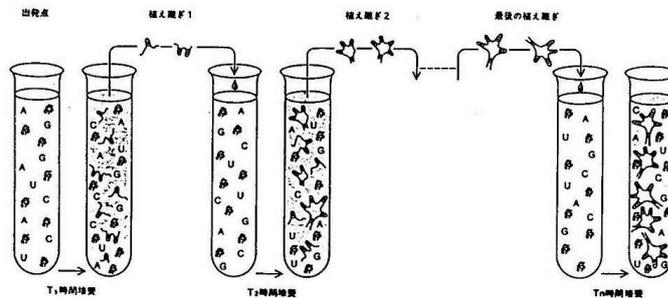


図 1-2 Spiegelman の試験管内 RNA 増殖実験。最初の試験管内に Q β -RNA を滴加し、一定時間 RNA の自己増殖反応が進行すると、その RNA 鎖を次の試験管に植え替えて第 2 世代の鋳型分子とする。この操作を何度も繰り返して約 74 世代まで植替え実験を続けた。

(ii) Eigen & Sumper の試験管内進化実験

Eigen は、化学分子種間の自然淘汰現象を検証するため Spiegelman の実験系に注目し、その追実験を行った。その結果、RNA の自己増殖反応は RNA 自身が触媒になる自己触媒反応であることを示したが、その中で画期的な発見があった。

<鋳型がなくても RNA 鎖の複製反応が起きる>

鋳型分子である RNA の濃度をどんどん低くして実験しているうちに、最初の鋳型分子である RNA がなくても RNA 鎖の増殖が起きることを発見した。鋳型分子が存在しないのに、どんな塩基配列の RNA が発生するのだろうか？ Eigen と Sumper はその反応機構を詳しく調べた。

鋳型なしの RNA の自己複製反応と自然淘汰実験

鋳型 RNA が存在しない状態で Spiegelman の RNA 培養実験を行った。最初の鋳型分子がな

くても、RNA 複製酵素はモノマー材料を重合して短い RNA 鎖を合成する。その培養液を 4 本の試験管に分取し、それを最初の鋳型として RNA の継代培養実験を継続した。

- ① 鋳型分子が存在しない状態で合成された RNA 分子は塩基配列がばらばらなので、はじめのうちは、試験管ごとの RNA 増殖速度のばらつきが大きい。
- ② 継代培養実験を続ける途中では重合度 60 程度の RNA オリゴマーがメジャーになる。
- ③ 長期培養の結果、淘汰がおきて各試験管は同じ増殖速度を示し、同じ生成物に収束したことを示唆している。選択された RNA 鎖の重合度は 150–250 程度であった。自然淘汰された RNA 鎖の特徴は、Spiegelman の実験で Q_{β} -RNA の継代培養の結果自然選択される短縮型 RNA 鎖に類似している。鋳型なしの実験で自然選択された RNA 鎖は midvariant-RNA と名付けられ、1 本鎖 RNA の分子内には tRNA 様の相補的塩基対が多数形成され、対称的な 2 次構造分布をもっていた (図 1-3 参照)。その状況を考慮すると midvariant-RNA には tRNA のような 3 次元立体構造が形成されている可能性がある。

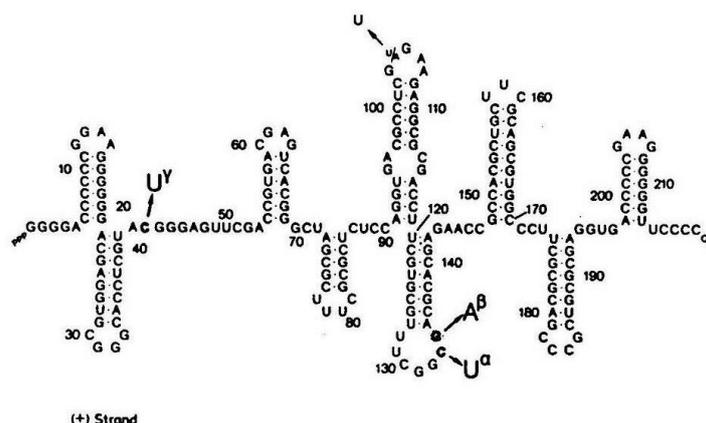


図 1-3 midvariant-RNA の構造：鋳型なしの RNA 自己増殖実験の結果、自然淘汰によって生まれた RNA 分子。Spiegelman の Q_{β} -RNA の植替え実験によって、最終的に出現する短縮型 RNA 鎖とよく似た特徴を持っていた。

培養条件を変えると自然淘汰される RNA 分子の情報も変化する。試験管内で RNA 分子種の自然淘汰が起きているが、選択される RNA 分子の塩基配列情報を決めているのは何だろう。次のようなものがその要因として考えられる。

Q_{β} -RNA 複製酵素と鋳型 RNA の相互作用の強さ、培養液の物理化学的条件（温度、pH など）、RNA 分子を分解する因子など（例えば分解酵素）が存在すると、その因子に対する耐性（RNA 鎖の構造安定性）などが自然淘汰に影響を与えるだろう。

4) 進化分子工学の出現

上記のような鋳型分子なしの RNA 増殖実験をさらに発展させるために、その様子を自動的に観測することができる実験装置が工夫された。図 1-4 はコンピューター制御の連続定常流反応槽（進化の実験装置）を示している。長時間、RNA の植替え実験を継続する必要があるため、複製酵素やモノマー材料を再活性化するために、それらの試料を混合槽で準備し、それを連続培養槽に一定流量で供給する。また培養槽で RNA が爆発的に増殖しないように反応槽内に存在する RNA を一定流量で除去し、取り出した

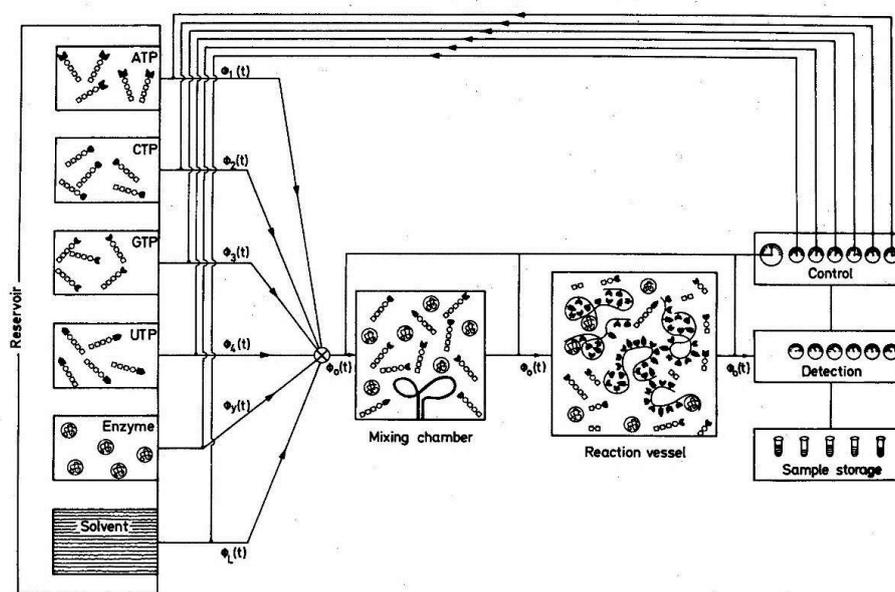


図 1-4 進化の実験装置：精製された Q_{β} 複製酵素や 4 種の NTP（ヌクレオシド 3 リン酸）を新鮮な溶媒と混合し（混合槽）、それを反応槽に送って RNA 鎖の自己複製反応を行う。反応槽内の RNA 分子の濃度を一定に保つように一定の割合で生成 RNA 分子を除去し（式 1.1 参照）、抽出された RNA 分子の物理化学的性質を情報として解析する。

RNA 鎖はモニター装置によって、その重合度や塩基配列を測定する。これは RNA の自己複製・淘汰に関する進化の実験装置である。反応槽内の環境条件を変えることによって自然選択される RNA 分子の機能を変更することが可能である。自然淘汰を応用して目的にかなう RNA 分子を設計することになるので、このような方法は進化分子工学と呼ばれるようになった。

5) 原始生命系「what was life?」: 自己増殖分子の起源

Q_βファージ RNA の試験管内自己複製反応と進化の実験は最初の自己複製分子が RNA であったような印象を与えるがそれは正しくない。その実験では Q_β-RNA 複製酵素というタンパク質の機能分子が存在していて、それが RNA の複製を行っている。L.E. Orgel は、原始的条件下では、RNA 分子自身が RNA の自己増殖を触媒しているのではないかと考えて実験を行った。

(i) 原始的条件下での自己増殖分子 — L.E. Orgel の実験

- ① オリゴリボヌクレオチドは、相補的塩基 (A と U, G と C) のモノマーを認識して塩基対を形成し、それを重合させて相補的オリゴリボヌクレオチドを生成することができる。
- ② オリゴ C を鋳型とし、活性化した A と G を 50 : 50 にして混合すると生成した重合物の G, A 含量の比は G:A=10 : 1 と成る。C は 90%の精度で G を識別することができる。
- ③ 特に Zn⁺⁺ 存在下では重合度 40 以上のオリゴ G が現れた。
- ④ 原始的条件下では、G:C ペアアは A:U ペアアより有利であった。形成される水素結合の数から G:C 対の方が安定であると考えられるからである。

以上が Orgel の実験結果である。「GC 塩基から構成される原始的 RNA 鎖は単独で自己複製できたであろう」と推定される根拠である。しかし、当然、問題点も多く残っている。鋳型 RNA (+鎖) から複製された相補的 RNA 鎖 (-鎖) が鋳型となって元の RNA 鎖 (+鎖) を複製できれば完全な自己複製系と呼べるが、その実験は成功しなかった。さらに、最初の RNA 鎖はどのように誕生したのかという疑問も残る。しかし、RNA のポリマーが相補的オリゴヌクレオチドを生成する触媒機能をもつことは、RNA 鎖が原始的条件下での自己複製分子であったという可能性を示唆する実験事実である。

<リボザイムの存在>

1981 年頃、テトラヒメナの rRNA 前駆体は自分のイントロンを切除する自己触媒作用を有することが発見された (T.R. Cech と S. Altman)。さらに、切り取られたイントロンの部分にはオリゴリボヌクレオチド合成反応を触媒する酵素機能が存在することが発見された。RNA は一本鎖の折りたたみによって空間的立体構造を形成し、酵素機能を持つ分子となる可能性がある。そのような分子は、Enzyme 機能を持つ RNA 鎖という意味からリボザイムと命名された。テトラヒメナの rRNA 内で発見されたリボザイムの他に、その後、別の酵素機能を持つリボザイムがいくつか発見されている。

(ii) 遺伝コードの起源

生命系発生のごく初期から存在していたと思われる tRNA 分子は現在約 200 種の存在が知られている。塩基配列は非常に良く保存されていて、進化の系統樹にもよく従っており、共通の祖先から進化してきたこと物語っている。系統樹の古いものほど GC の含量が多い。

tRNA の塩基配列を調べると RNY の 3 文字の繰り返し構造がある。R : プリン (A, G)、Y : ピリミジン (U, C)、N は 4 種の塩基のいずれかを表す。Shepherd の自己相関関数法を用いて解析すると、現存する DNA ウィルスにも RNY の繰り返し構造が見られることが分かった。G と C を主に使って 3 文字の塩基配列を作り、それを現在の遺伝コードと比較すると次のようになる。遺伝コード GGG : Gly、GCC : Ala、GAC : Asp、GUC : Val。上記のアミノ酸は、Miller の化学進化の実験 (放電実験) において、原始スープのなかに最も豊富に存在したものである。

(iii) RNA ワールド

原始生命は RNA の世界で始まったという仮説がある。これを RNA ワールドと呼んでいる。RNA は DNA と異なり、一本鎖の折りたたみによって立体構造を形成し、触媒機能を持つ自己増殖分子となる可能性を持つ。それが、原始生命を誕生させた自己増殖分子として RNA が注目されている理由である。現在の生物は DNA・RNA・タンパク質の自己増殖分子系であるが、DNA ワールドの誕生以前に、RNA・タンパク質の自己増殖分子集団が存在したのではないだろうか。実際、リボソームは RNA とタンパク質の複合体であり、進化の初期の段階に現れたと考えられている。現存する生物においても、リボソームは tRNA を介して mRNA の遺伝情報をタンパク質に翻訳する重要な分子器官である。

RNA ワールドから DNA ワールドへの変革は、RNA 鎖を DNA 鎖に転写する逆転写酵素の出現によって引き起こされたと想像される。逆転写酵素は 1970 年に発見された。RNA の遺伝情報から逆転写によって DNA 鎖が合成されるというセントラルドグマを反転させる発見であった。このような酵素が発見されたことは、RNA ワールドから DNA ワールドへの革命が実際に起きたことの痕跡ではないだろうか。

第2章 タンパク質立体構造とその構築原理

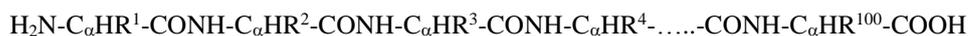
タンパク質 = PROTEIN = PROTEIOS【ギ】 = PRIMARY【英】 = 最初の物質

2014年の時点で、X線結晶解析やNMR分光法によって分子の立体構造が解明されているタンパク質分子の数は約100,000である。これらのデータはProtein Data Bankに登録されている。しかし、同一タンパク質の変異体などの構造データも登録数に含まれていて、折りたたみ構造が基本的に異なるタンパク質の数は数100程度である(スーパーファミリーとして分類されている)。つまり、タンパク質の立体構造は、そのアミノ酸配列の多様性に比べて、極めて限定されているのである。C. Chothiaの概算では、今後発見されるタンパク質も含めて、その数は高々1000個程度であろうと予測されている。

§4 タンパク質立体構造の基礎知識

1) ポリペプチド主鎖の構造

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合で重合したポリペプチド鎖である。その化学構造は下記のように表される。ペプチド鎖のNH₂端(N末端)から順に残基番号をふつて、COOH端をC末端と呼ぶ。100残基のタンパク質の場合、Rを側鎖として以下のようになる。C_α、CONHはそれぞれC_α原子、ペプチド結合を表す。



<用語> アミノ酸残基、主鎖、側鎖、ペプチド結合

主鎖の構造には階層性があるように分類されている。

- ① 1次構造：アミノ酸配列
- ② 2次構造：部分的な規則構造(αヘリックス、βシート、βターン)
- ③ 超2次構造：モチーフとも呼ばれる。2次構造の集合体(α-helix bundle、βヘアピン、ロスマンフォールド：βαβ構造)
- ④ 3次構造：折りたたみ構造単位(folding unit)を立体的に折りたたんだ構造
- ⑤ 4次構造：一般に球状構造をとるドメインがさらに集合した分子集合体

図2-1、2-2はリゾチームの1次、2次、3次構造を表したものである。

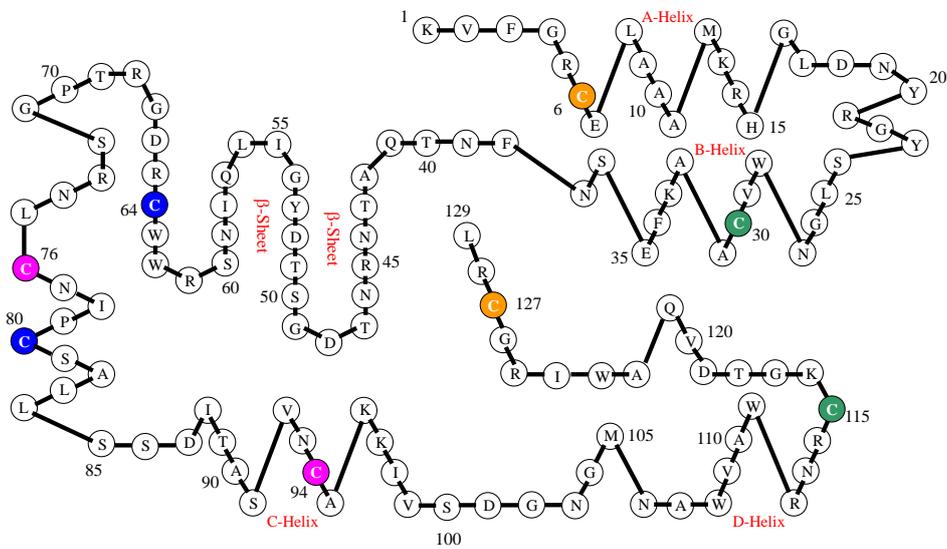


図 2-1 リゾチーム分子の 1 次構造（アミノ酸配列）と 2 次構造（A-, B-, C-, D-helix と β -sheet）

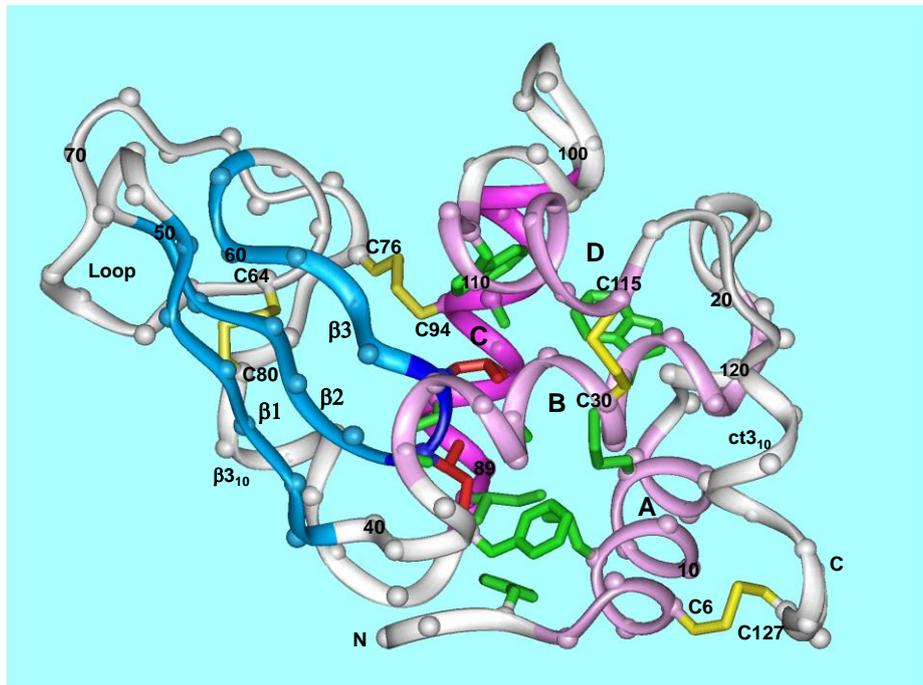


図 2-2 リゾチームの 3 次構造。紫色は α -helix 青色は β -sheet を表す。黄色は Cys 残基間の SS 結合。一部の残基の側鎖が描かれている（疎水性コアと名付けられた領域）。PDB 6LYZ のデータを用いて描いた。

2) Ramachandran Plot

- (i) 2面角の定義 (図 2-3 参照) : ペプチド結合 (-CO-NH-) の C-N間の2重結合性のために、この4つの原子は同一平面上にある。従って、隣接するペプチド結合は C_α 原子の両端にある1重結合軸の周りの回転によって平面間の角度が変化するので、これを2面角と呼ぶ。内部回転角は N- C_α 側を ϕ 、 C_α -C 側を ψ と名づける。ポリペプチドの主鎖構造は1残基当り2つの内部回転角 (ϕ, ψ) を指定することによって完全に決まる。
- (ii) 1つのアミノ酸残基内の原子間衝突によって、とり得る2面角の値は極めて制限されている。図 2-3 右上の実線部内の領域は側鎖として -CH₃ を付けたとき、van der Waals 半径の剛体球の原子間衝突を避けることができる (ϕ, ψ) の領域を示す。

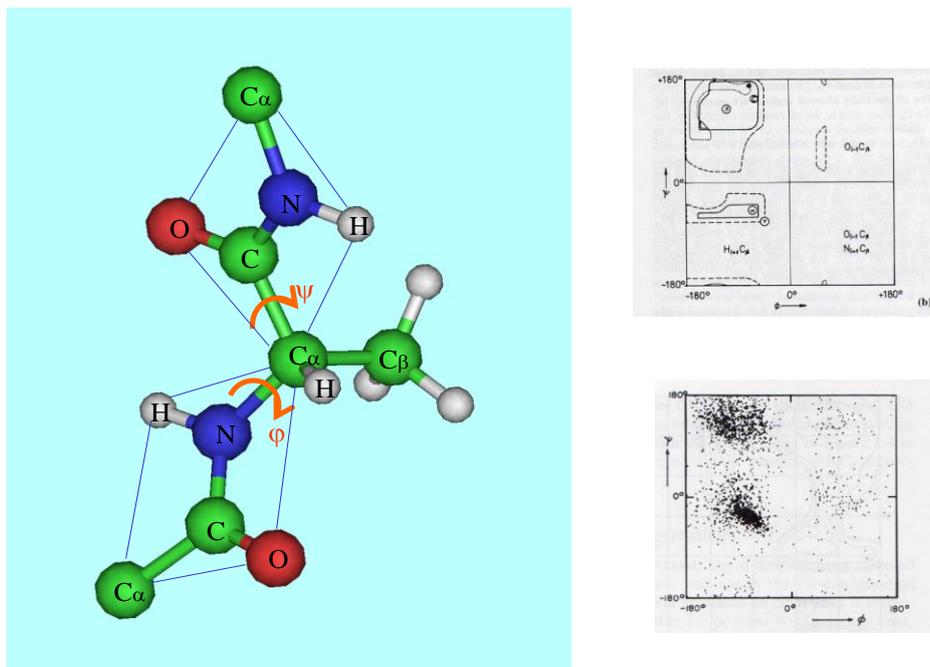


図 2-3 主鎖2面角 (ϕ, ψ) の定義 (左) と Ramachandran Plot (右)。右図の横軸が ϕ 縦軸が ψ である。右上の点線で囲まれた部分が許容領域。右下の点は実測された (ϕ, ψ) 値を表す。

- (iii) 2面角 (ϕ, ψ) の Ramachandran Plot : 図 2-3 右下は、X線構造解析によって立体構造が解明されたタンパク質 (当時 13 種) の原子座標から2面角 (ϕ, ψ) を計算し、それを2次元の (ϕ, ψ) 平面上にドットで表してプロットしたものである。

現実に観測される (ϕ, ψ) 値は右上に示された許容領域とよく一致している。すなわち、タンパク質の主鎖の構造は、主鎖に沿う剛体球の構成原子が衝突しないようにコンパクトに折りたたまれた構造だと言える。

3) 20 種類のアミノ酸の側鎖の構造 (図 2-4 参照)

アミノ酸の側鎖の構造にも内部回転角が存在し、 χ_1, χ_2, \dots と名付けられている。側鎖の内部回転角に対しても X 線結晶解析の結果から、その Ramachandran Plot を求めることが出来る。主鎖と同様にやはり制限があることが分かる。

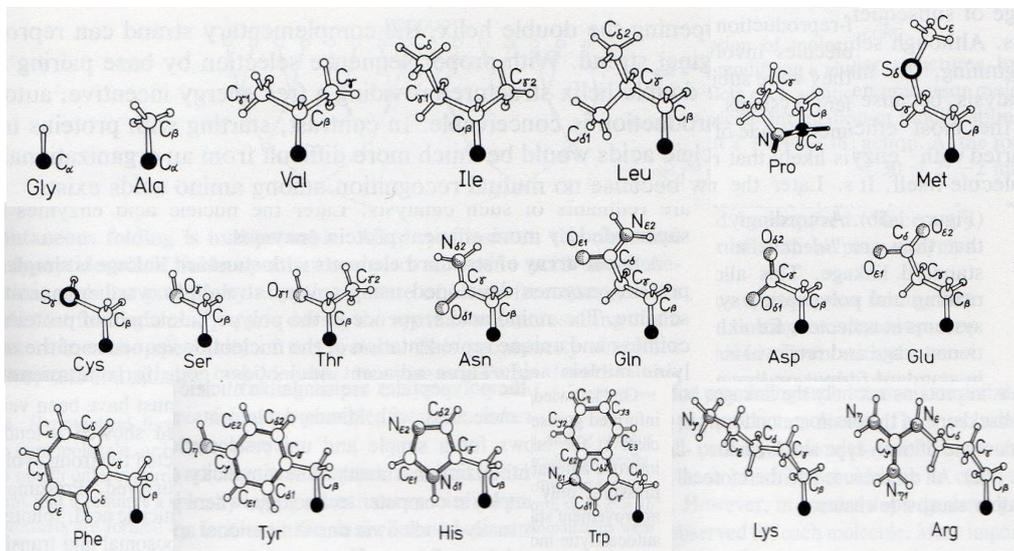


図 2-4 アミノ酸の側鎖構造。芳香環をもつアミノ酸以外に側鎖末端に平面性の基をもつアミノ酸は Asp, Glu のカルボキシル基、Asn, Gln のアミド基、Arg のグアニジル基である。

§5 ポリペプチド鎖の 2 次構造

数残基にわたって一定の (ϕ, ψ) 値をとる主鎖構造が繰り返えされると、規則的な 2 次構造が現れる (図 2-5 参照)。その構造の特性について考察してみよう。

1) ヘリックス構造

(i) α ヘリックス: (ϕ, ψ) = ($-57^\circ, -47^\circ$) 近傍の 2 面角をとる残基が続く。

CO 基と 4 残基先の NH 基の間に水素結合が形成され安定構造となる。実際のタン

パク質分子中に頻繁に見出される。7, 11, 15 残基から成る α ヘリックスが多い。平均すると約 17Å のシリンダー状の構造である。

- (ii) 3_{10} ヘリックス、 π ヘリックスと呼ばれるヘリックス構造が考えられるが、現実には立体障害が残るため観測例はそれ程多くない。

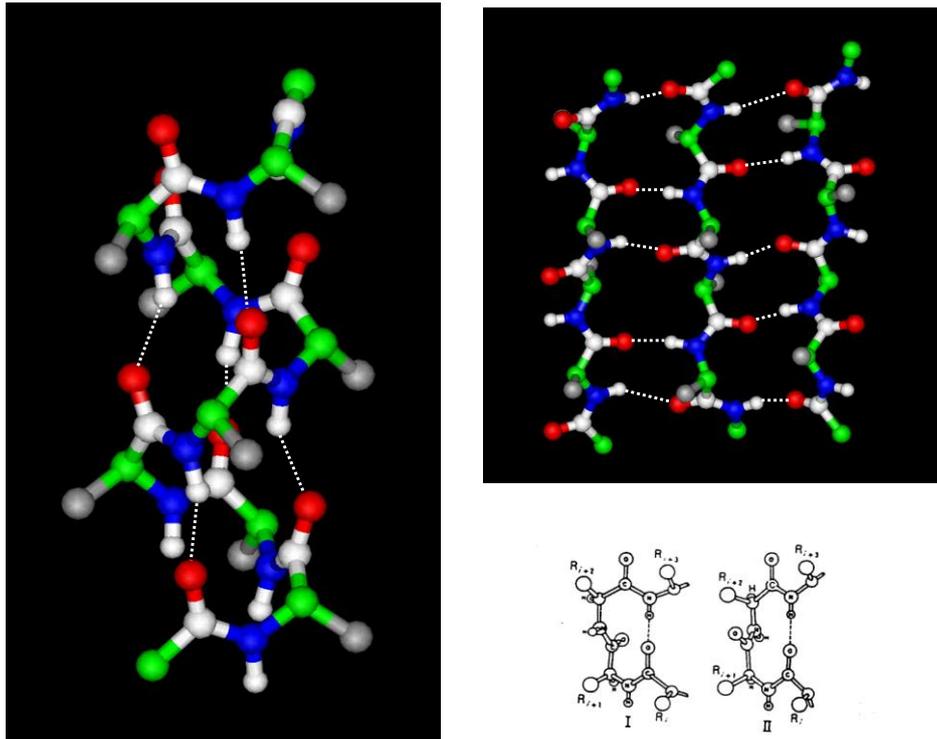


図 2-5 タンパク質主鎖の規則構造。 α -helix (左)、反平行 β -sheet (右上)、 β ターン (右下)。C $_{\alpha}$ (緑) N (青) C (白) O (赤) C $_{\beta}$ (灰) H (小さな白) である。点線は水素結合を表す。

2) シート構造： $(\phi, \psi) = (-139^\circ, +135^\circ)$ 近傍の 2 面角が連続して現れる。

- (i) 平行、反平行のシート構造：ポリペプチド鎖が伸び切った糸状（ストランド）の構造になる。隣あう鎖間の CO 基と NH 基の間に水素結合が形成されて安定構造をとる。ほとんどの場合、反平行型の β シート構造をとる。
- (ii) タンパク質に実在する β シートの平均構造：5-7 残基から成る鎖が 5-6 本平行（あるいは反平行）に並んだシート構造をとる。
- (iii) シート状の鎖は平坦な平面状に並ぶのではなく、左巻きに約 25° ねじれた平面となる。 β ツイスト構造と呼ばれる。

3) 折り返し構造 (β ターン)

- (i) 3つのアミノ酸間で水素結合が1つ形成され、鎖がヘアピン状に折り返される。
- (ii) 折り返し構造 I, II が知られている。3つのアミノ酸の中央にはしばしばグリシンが現れる。折り返し構造は疎水性の低い部位、すなわち分子表面によく現れる。

4) 超2次構造

数個の2次構造が組み合わされてコンパクトな構造が形成される。多くのタンパク質に共通してそのような構造単位が現れるのでモチーフ構造と呼ばれることもある。

- ① α ヘリックスどうしが反平行に並ぶ α ヘアピン構造。 α 型タンパク質の基本構造。
- ② β ストランドが反平行に並ぶ β ヘアピン構造。 β シートの基本構造。
- ③ $\beta\alpha\beta$ と3つの2次構造が右巻きに折れたたまった構造。Rossman fold と呼ばれる。平行 β ストランドがツイストした構造をしている。 α/β 型タンパク質の基本構造。

§6 タンパク質の立体構造 (3次構造)

1) 立体構造の類別

タンパク質の立体構造は非常に多様性にとみ、多種多様な立体構造が存在するように思われるが、その立体構造を2次構造によって分類すると案外規則性のあることが分かってきた (図 2-6 参照)。

- ① α 型タンパク質：ヘモグロビン (globin fold)、チトクロム c (cytochrome fold)、TMV コートタンパクなど。
- ② β 型タンパク質：免疫グロブリンの各ドメイン (immunoglobulin fold)、コンカナバリン A。
- ③ $\alpha+\beta$ 型タンパク質：リゾチーム、リボヌクレアーゼ A、ウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) など。
- ④ α/β 型タンパク質：Rossman fold を基本とする。解糖系の酵素はほとんどこの型。チオレドキシン、カルボキシペプチダーゼ A、トリオースリン酸イソメラーゼ (TIM)。
- ⑤ コイル型タンパク質：麦芽アグルチニン

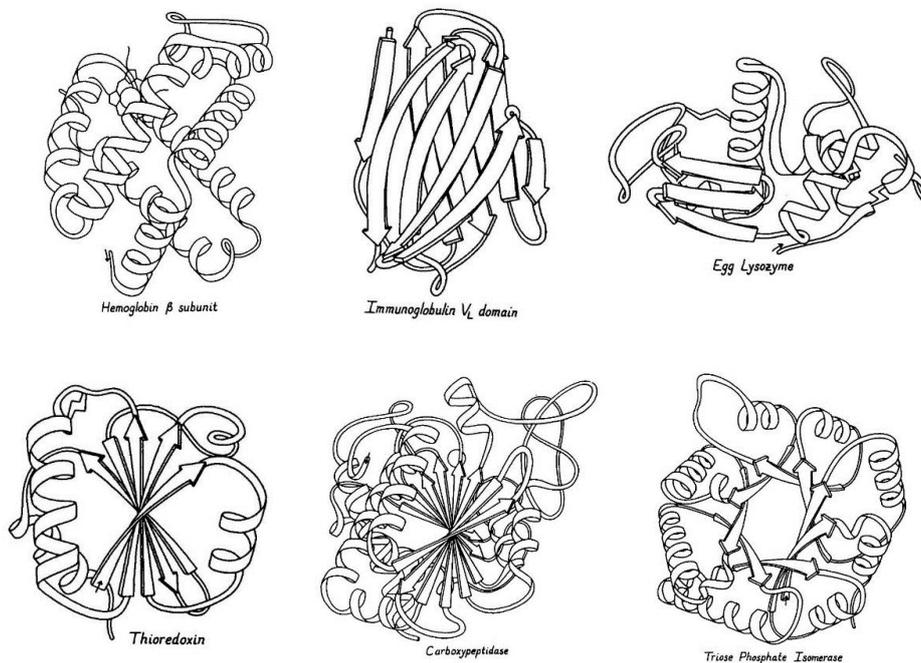


図 2-6 タンパク質立体構造の類別：ヘモグロビン β サブユニット（上左）、免疫グロブリン V_L ドメイン（上中）、リゾチーム（上右）、チオレドキシシン（下左）、カルボキシペプチダーゼ（下中）、トリオースリン酸イソメラーゼ（下右）。

2) 4次構造の例：図 2-7 および図 2-8 参照

(i) 免疫グロブリン G (IgG)：血液中に最も多く存在する抗体分子

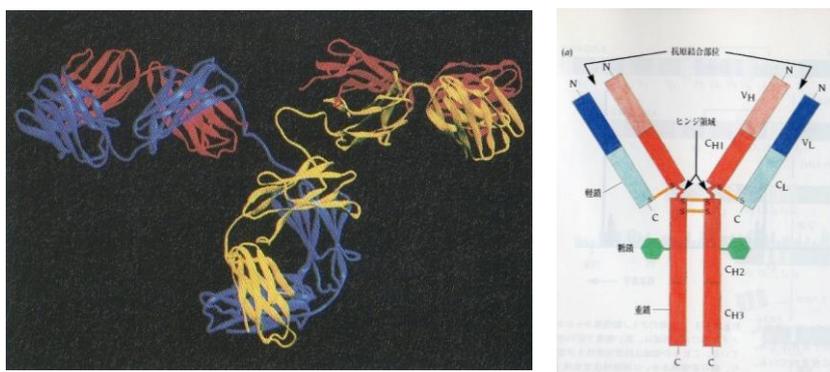


図 2-7 免疫グロブリン G (IgG)：L 鎖 (MW=23,000) 2 個のドメイン、H 鎖 (MW=50,000) 4 個のドメイン。各ドメインは約 120 個のアミノ酸残基で構成されていて、極めてよく似た β シートのサンドウィッチ構造をしている(図 2-6 参照)。Y 字型の先端に抗原結合部位がある。

- (ii) 紅色細菌 (purple bacteria) の光合成反応中心 : L 鎖、M 鎖、H 鎖とチトクロムから構成されている。L、M 鎖は膜を貫通する 5 本の α ヘリックスから成る。
- (iii) タバコモザイクウイルス (TMV) の分子構造 : 1 本鎖 RNA (6395 塩基長) と、それを被うコートタンパク質 (モノマー粒子数 2130 個) から構成された超分子。

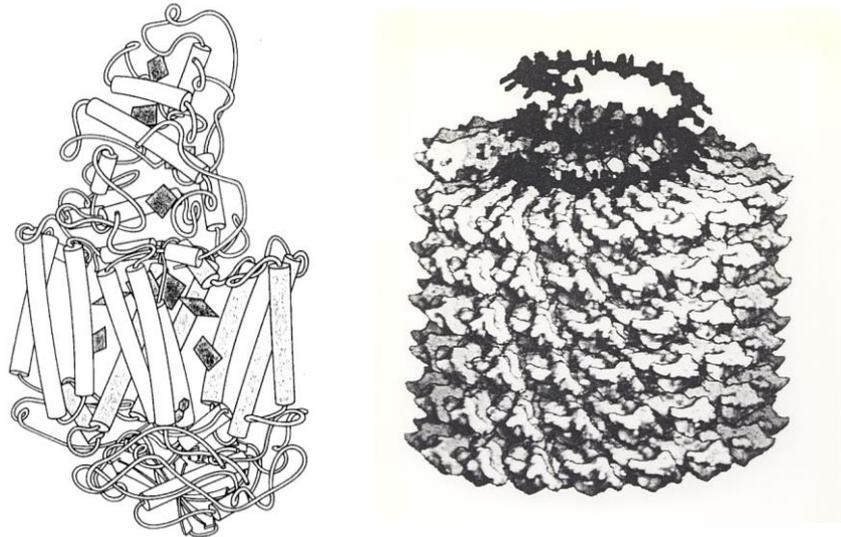


図 2-8 超分子の例 2 つ。左 : 光合成細菌の光反応中心、4 個のサブユニットから構成されている。中央部分が膜貫通 α -helix (サブユニット L と M)、下部はサブユニット H で 1 本の膜貫通ヘリックスをもつ。上部はチトクロム。黒い平板状の分子は光合成色素とヘムを表す。右 : TMV の超分子構造 : 中心部に黒く見えるラセン状の分子が RNA、その周りで粒のように見えるものがコートタンパク質。補遺で TMV の構造形成反応の様子を考察する。

3) 類似の折りたたみ構造をしたタンパク質 : 立体構造の構築単位

- ① ミオグロビン、ヘモグロビン (globin fold)。
- ② 種々のチトクロム c (哺乳動物から光合成細菌まで)。
- ③ 種々の α タンパク質は α ヘアピン構造単位から構成。
- ④ キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼなど。
- ⑤ トリプシンインヒビター、オボムコイド、サテライシンインヒビターなど。
- ⑥ 各種のリゾチーム、 α ラクトアルブミンなど。
- ⑦ 解糖系の種々の酵素に見いだされる β バレル構造 (TIM、タカアミラーゼ A など)。

アミノ酸配列は異なっても立体構造はよく保存されることが多い。ゲノムプロジェクトで新しく見出される遺伝子のうち約 1/3 は、アミノ酸配列既知のタンパク質の

いずれかと類似のアミノ酸配列をしている。アミノ酸配列が異なる新規タンパク質でも、そのうち約 1/4 は立体構造既知のタンパク質（約 120 種）のいずれかと類似の構造をとっている。この考えを敷衍すると、折りたたみ構造が基本的に異なるタンパク質の立体構造の数は、およそ $120 \times 4 \times 3 \approx 1500$ 個程度と推定される（C. Chothia）。

§7 アミノ酸残基と 2 次構造への出現頻度

立体構造既知のタンパク質の構造データを用いて、アミノ酸残基毎にどの 2 次構造に出現する頻度が高いかという統計データをとると、アミノ酸残基の個性をかなり明瞭に抽出することが出来る。

- ① 多くの残基は一般に α ヘリックスを好む。
- ② C_{β} 分岐型残基（Val, Ile, Thr）と芳香族残基（Phe, Tyr, Trp）は β ストランドに出現頻度大。
- ③ 小さい極性残基（Ser, Asp, Asn）や Gly、Pro は折り返し構造に出現頻度大。
- ④ OH 基を持つ残基（Ser, Thr, Tyr）は、その OH 基が主鎖の CO 基と水素結合を作って α ヘリックスを壊す傾向が強い。
- ⑤ 電荷を持つ残基（Glu, Asp, Lys）、アミド基を持つ残基（Asn, Gln）は β 構造を嫌う。

その他、 α ヘリックスの N 末端側の正電荷と C 末端側の負電荷はヘリックスを安定化させる効果を持っている。このようなアミノ酸残基と特定の 2 次構造との相関関係を基にして、アミノ酸配列の情報から 2 次構造を予測しようという試みが多数発表された。有名なものは、例えば、Chou - Fasman の 2 次構造予測法である。近年、その方法は改良が重ねられていて、Bioinformatics と呼ばれる研究分野が急速に成長してきている。

§8 タンパク質の内部と表面、立体構造の構築原理

リボン模型のタンパク質は主鎖の折りたたみのトポロジーを知るには優れた方法である。しかし、それではタンパク質内部への原子のパッキングの詳細や、タンパク質分子の表面の様子を知ることが出来ない。この点に注目して、F.M. Richards はタンパク質分子に対して表面積、体積という概念を持ち込んだ。図 2-9 は水分子の溶媒に取り囲まれたタンパク質分子の様子とその分子表面を陽に描いたものである。

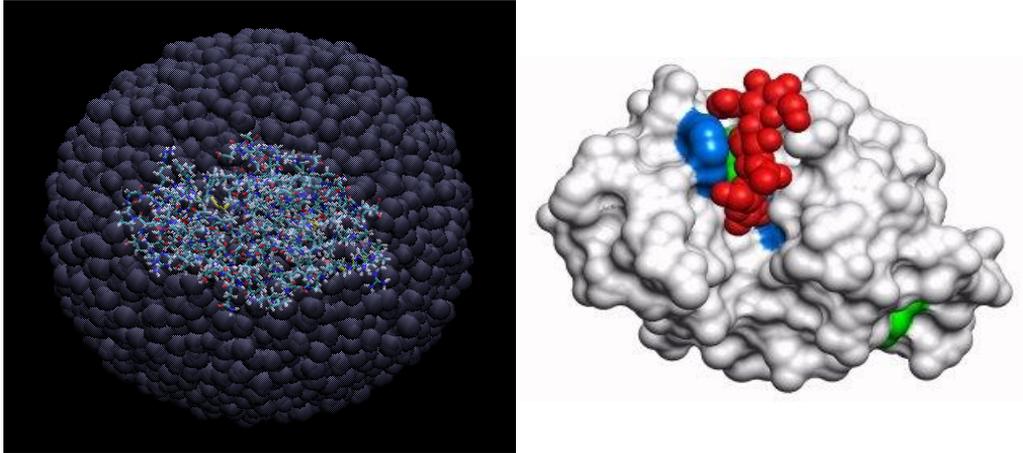


図 2-9 溶媒中のリゾチーム分子。左：球状に分布した水分子中に存在するリゾチーム。
右：リゾチームの分子表面、赤色はリゾチームの活性部位の溝に結合した基質の N-アセチル
グルコサミン 3 量体。

1) 分子内部の原子充填密度

PDB から取り出したタンパク質の原子座標を用いて、原子の中心位置を結ぶ直線の垂直 2 等分面で分割される Volonoi 多面体を描くことができる。この多面体は、互いに重なり合うことも無く、また隙間を残すことも無く空間を細分割することが出来る。1 つの Volonoi 多面体には必ず 1 個の原子が含まれているので、原子充填密度 η という概念が導入された。 $\eta = v_{vw} / v_a$

v_{vw} : van der Waals 半径の球としての原子の体積

v_a : タンパク質中で原子 1 個に割り当てられる Volonoi 多面体の体積

種々の物質に対して原子充填密度を計算すると、

タンパク質内原子 → 平均 0.75

同一球の最密充填 → 0.74

有機分子の結晶 → 0.70 - 0.78

液体の水 → 0.58

液体のシクロヘキサン → 0.44

タンパク質内部は結晶に近い原子充填密度を持つことが明らかになった。Schrödinger が指摘したとおり、タンパク質はまさに「非周期性結晶」という物理的特性をもつ物質であった。従来、タンパク質は水中にある油滴に類似しているという考え方（油滴模型）があったが、複雑な構造をしたポリペプチド鎖が結晶のように固いのである。この異常に高い原子充填密度が、非共有結合力という弱い van der Waals 力でタンパク質の秩序構造を維持できる源である。

2) タンパク質の露出表面

タンパク質表面に沿ってプローブ球（水分子 H_3O^+ を球と近似）を転がしたとき、その包絡面の表面積を露出表面積として定義する。

a_i : アミノ酸モノマーの側鎖の露出表面積

a_p : タンパク質中にあるアミノ酸残基の側鎖の露出表面積の平均値

露出度 = a_p/a_i をアミノ酸残基の側鎖別に計算した。

Phe (0.12), Ile (0.13), Met (0.18), Val (0.16), Trp (0.14), Tyr (0.24)

Asp (0.40), Asn (0.38), Glu (0.36), Gln (0.38), Arg (0.42), Lys (0.52)

上記のデータは、現実に存在するタンパク質の立体構造において、疎水性アミノ酸がタンパク質内部に埋没し、親水性アミノ酸が露出している事実を明瞭に示している。

3) タンパク質立体構造の構築原理

上記のようなタンパク質立体構造の特性を考慮して、タンパク質の立体構造の構築原理を考察してみよう。

- (i) 粗い精度で立体構造が形成される：非特異的な残基間の相互作用であるが、露出した疎水性残基による水溶媒のエントロピー減少を避けるため、疎水性残基を分子内部に折りたたみ、親水性残基を溶媒に露出させる。また、分子内に埋没した疎水性残基間の **van der Waals** 力を最大限獲得できるようにタンパク質の粗い構造を選択する。
- (ii) 特異的相互作用による詳細構造の形成：タンパク質の内部には水素結合のネットワークが張りめぐらされている。 α ヘリックスや β シートなどの安定化だけでなく、水素結合可能な原子（NHあるいはOH）は、ほぼすべて（98 - 99%）水素結合形成に関与している。各残基が可能な限り水素結合に関与できるようにタンパク質の詳細構造が選択される。
- (iii) 上記2つの要因が両方とも満たされるような立体構造が選択されるとき、ヘテロなアミノ酸が重合した高分子であるポリペプチド鎖が結晶のように原子充填密度の高い特異な秩序構造を形成する。

多様なアミノ酸が重合したタンパク質分子は上記のような残基間相互作用の条件を満足しなければならない。アミノ酸配列の異なるタンパク質の数は重合度を100とすると 20^{100} にもなるが、現実に存在するタンパク質はその極々一部に過ぎない。その理由は、極めて限定されたアミノ酸配列だけが上記のような条件を満足することができて、安定な立体構造形成を許されているからである。

第3章 タンパク質の折りたたみ問題

§9 なぜタンパク質の折りたたみ問題なのか

塩基配列情報が急速に蓄積されてきた。その情報を解読して知りたい究極の問題は、その遺伝子上にどんな分子素子がコードされているかということである。もちろん分子素子はタンパク質であり、アミノ酸配列に変換することは難しくない。最終目標はアミノ酸配列からタンパク質の立体構造を知ることだが、今もまだその目標は実現できていない。問題解決につながるためには、タンパク質の折りたたみ反応の道筋を追跡する必要がある。それが分かれば立体構造構築のルールも見えてくるだろう。しかし、それを困難にしている大きな壁はタンパク質の構造変化がall-or-noneだという事実である。すなわち、構造変化の中間状態の検出が極めて困難なのである。タンパク質はアミノ酸の繋がったポリペプチド鎖である、その鎖状高分子のフォールディングーアンフォールディング (folding-unfolding) という現象を考察してみよう。

1) タンパク質の構造変化はNとUの2状態転移である

タンパク質立体構造の構築原理を理解するためには、鎖をほどいて、再び折りたたむ過程の構造変化やエネルギー変化を物理的に考察する必要がある。図3-1はリゾチームのX線構造解析が成功した直後の1966年にD.C. PhillipsがRoyal Institutionで行った講演の写真である。当時はヘモグロビンのような α ヘリックスばかりのタンパク質で



図3-1 D.C. Phillipsが1966年にRoyal Institutionで行った一般講演の写真。1998年のNature Structural Biology誌に掲載されたもの。会場のどこかにW.L. Braggが写っているそうである。

(b)

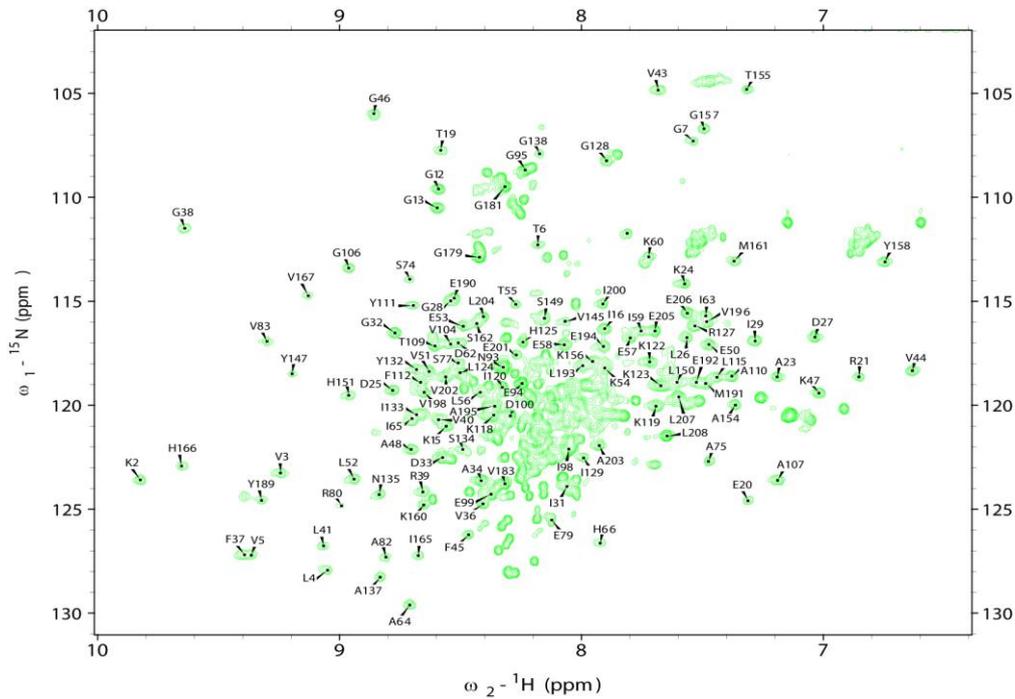


図3-2 PCP (残基数208) の折りたたみ反応過程のNMR分光法による観測結果。スペクトルの周辺部に現れる鋭いピークがN状態由来の共鳴ピークで残基名が付記されている。(a) : 反応開始直後 (サンプルの前調整と測定時間などを含めると2 hr 後) のスペクトルを表している。N状態由来のピーク名が示されているが、ピークはほとんど現れていない。(b) : 15 hr 後のスペクトル。折りたたみ反応の実験条件は pH2.5, 30°C, 反応の進行と同時にNMR測定を行う。

反応開始直後のもの (a) と15 hr 経過後のもの (b) が示されている。スペクトルの中央部には名前のないピークが存在するが、これはU状態にあるタンパク質による共鳴ピークである。NHプロトンの共鳴周波数が縮退してピークの分散が小さい。また、U状態にあるタンパク質は、いわゆる「モルテングロビュール」状態をしているので、各残基は一樣な環境にないため共鳴ピークは広幅化して分解能が悪い。一方、折りたたみ反応が十分進行すると、スペクトルの周辺部に明瞭な鋭いピークが現れ、これがN状態にあるタンパク質由来のNHプロトンの共鳴線である。ピークは分散がよいので、各残基に帰属されて、ピークに残基名が明記されている (反応初期のスペクトルにも残基名が記入されているが、ピークとは認められないほど小さい)。U状態にあるピークに対して、9M Ureaのような溶媒中で測定するとPCPのN末端側の半分はランダムコイル状態に

なるので、明瞭なピークが現れピーク帰属は終えているが、残基名は付記していない。

図3-2のピーク体積の時間変化を測定し、U状態由来のピークが消えていく時定数とN状態由来のピークが出現する時定数を残基毎に示したものが図3-3である。折りたたみ反応は全残基がほぼ同期して進行することが分かる。NMRスペクトルを詳細に検討しても、折りたたみ中間体に起因するようなピークは検出されなかった。

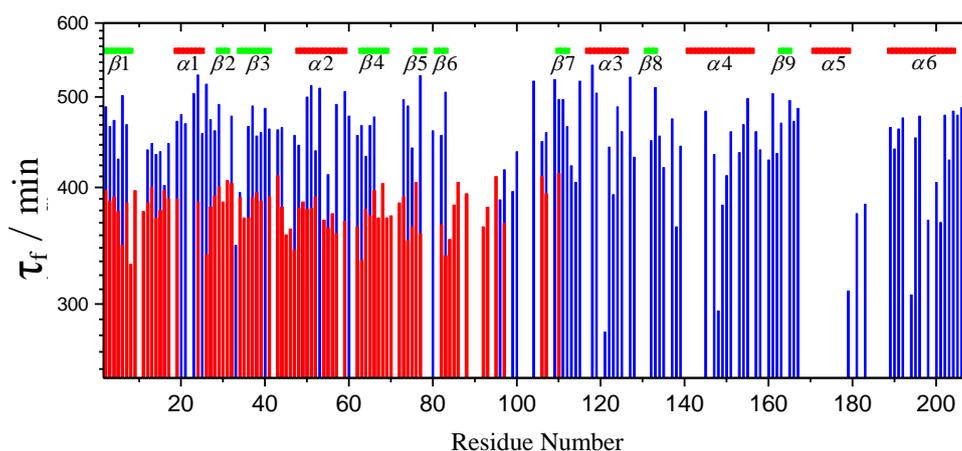


図3-3 残基毎の折りたたみ反応速度。青：N状態由来のピークが出現する時定数、赤：U状態由来のピークが消えていく時定数。グラフ上部の α とか β は2次構造の分布を表す。 α -helixが β -strandより速く形成されるという傾向は見当たらない、ほとんど全ての残基が一斉に折りたたまれる。赤の時定数の平均が青の時定数より1 hr 程速い理由は不明。

タンパク質の構造変化を熱測定によって観測することも可能である。高感度の熱測定装置が開発されていてタンパク質の構造変化に伴う吸熱-発熱量を直接観測することができる。測定されたエンタルピー変化量は ΔH_{cal} と表される。一方、U-N変化を化学反応と捉え、化学反応の平衡定数 K を測定し（分光学的にも熱測定法的にも K を決めることはできる）、 $\ln K$ を $1/T$ に対してプロットして、その接線の勾配から化学反応のvan't Hoff enthalpy (ΔH_{vH})を測定することができる： $\partial/\partial(1/T)\ln K = -\Delta H_{vH}/R$ 。小さな球状タンパク質の場合、この2つのエンタルピーの値はほぼ一致する。これも、タンパク質の構造変化が2状態転移（all-or-none 転移）であることの直接的証明である。

2) N-U転移 (2状態転移) における協同性 (Cooperativity)

タンパク質立体構造のフォールディングはなぜ2状態転移なのだろう。途中の部分

構造で立ち止まることは許されない。N-U転移の重要な特徴は構造変化の協同性 (Cooperativity) である。天然立体構造は結晶と同程度に原子が密に充填された構造であった。アミノ酸残基間の相互作用を分類すると、アミノ酸配列上近接していて空間的に隣接している残基間の短距離相互作用と、配列上は遠く離れているが空間的には隣接している遠距離相互作用に分類される。Cooperativity (協同性) とは、この短距離相互作用と遠距離相互作用が首尾一貫して機能して立体構造が形成されるということである。 α ヘリックスや β ストランドという規則構造は短距離あるいは中距離相互作用によって安定化され部分構造として選択されるが、このようにして選択された2次構造がさらに安定化されるためには、この部分構造を安定化する遠距離相互作用が必要である。van der Waals力の特性を考えると、この遠距離相互作用は特定の残基対が隙間なく「ぴったり」と充填できるということである。その2つの相互作用が協同して働かないと、選択された2次構造は壊れて鎖は再びU状態に戻ってしまう。2次構造がジグソーパズルの「ピース」とすれば、隣にぴったり適合する「ピース」が配置されないと全体構造は安定化されない。そのような意味で、タンパク質の立体構造形成は「ジグソーパズル」にたとえられる。短距離相互作用と遠距離相互作用の協同性が成り立たないと、タンパク質の立体構造形成は完成しない。それがN-U構造転移の2状態性である。

3) タンパク質の立体構造形成は3次元ジグソーパズル

ジグソーパズルは通常2次元平面上で様々な形状のピースを組み合わせて全体図を完成させる。しかし、絵の完成のためにピースの組み合わせはどこから始めても構わない。全体図の端からでも中央からでもよい。さらに、ばらばらにできた部分構造を寄せ集めても全体の絵は完成する。しかし、タンパク質の立体構造形成は一本道である。構造形成の開始部位はどこでもいいわけではない。適切でない場所で部分構造が形成されると、部分構造間の立体障害のためにそれ以上部分構造を大きくすることができない。部分的な秩序構造を寄せ集めるときも順序を間違えると、同様の立体障害のために、それ以上構造形成は進まなくなる。つまり、2次元ジグソーパズルのように進まないのである。この様子は寄木細工を完成させるときの状況によく似ている。つまり、タンパク質の立体構造形成は、2次元ジグソーパズルではなく3次元ジグソーパズルだと言えることができる。構造形成開始部位は限られていて、N状態に到達するためには部分構造を寄せ集めていく順序もかなり厳密に決まっている。つまりタンパク質の折りたたみ反応

は少数に限られた「折りたたみ経路」しか許されないのである。

§10 タンパク質の折りたたみ反応の計算機シミュレーション

タンパク質の折りたたみ反応の一般的特徴を説明したが、そのような特性がどうして現れるのかを理解するためには、単純化された模型タンパク質の計算機シミュレーションを見るとよい。「一目瞭然」タンパク質の立体構造の揺らぎの特徴がよく分かる。

1) タンパク質の格子模型

タンパク質の立体構造は、短距離、中距離、遠距離の相互作用の分布によってその構造の特徴を表現することができる。格子点上に残基を配置し、それを残基番号順に連結した鎖状の格子模型タンパク質を考える。鎖の折りたたみ方の違いを考慮して、代表的な3つの格子タンパク質を考える。図3-4の上段左は $2 \times 2 \times 16 = 64$ の格子点上に残基を配置してヘリックス状に連結した棒状ヘリックスである。中央の図は $4 \times 4 \times 4 = 64$ の格子点を α 構造、 β 構造の繰り返しとなるように連結した α/β 型タンパクである。最後の右図は $4 \times 4 \times 4 = 64$ の格子点を不規則な一筆書

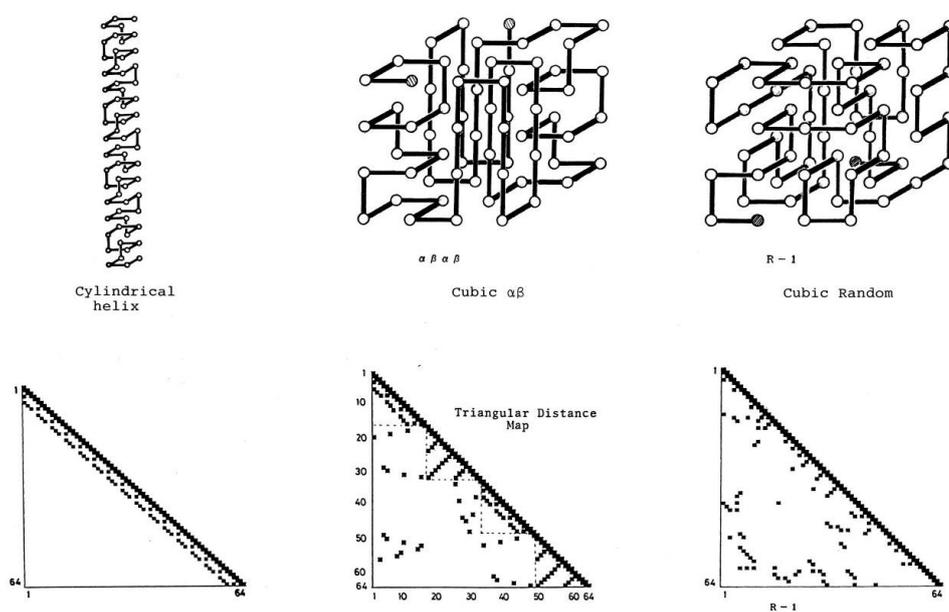


図3-4 格子模型タンパク質と残基間特異的相互作用。上段は格子模型のタンパク質を表す。下段は隣接する残基間の特異的相互作用を三角マップ上に表したもの。左：棒状ヘリックス、中： α/β 型タンパク質、右：R-1型タンパク質。

きで連結した構造で R-1 型タンパク質と名付けた（以後は単に R 型と呼ぶ）。 α/β 型タンパク

の場合は、相互作用の協同性が働くユニット (cooperative unit) が 16 残基から成る α 構造あるいは β 構造であるが、R 型の場合は、64 個の格子点全体が 1 つの cooperative unit である。このような、格子点の連結様式の違いは、立体構造の折りたたみ反応とどのような関係があるのだろうか。それをこれから考察する。

2) 特異的相互作用マップとタンパク質の島模型

タンパク質は 64 個の格子点に対応しており、格子模型タンパク質が N 状態にあるとき、隣接格子点間には N 状態を安定化する特異的相互作用が働く。N 状態にあるとき、格子点が隣接している残基対を三角マップ上に黒丸で表すと (図 3-4 の下段参照)、 α/β 型の場合も R 型タンパクの場合も黒丸は合計 81 点存在する (残基自身とそれが隣接することを表す黒丸は除く)。棒状ヘリックスの場合は 61 点である。これらの特異的相互作用は配列上の残基間距離に応じて短距離、中距離、遠距離相互作用と分類されるが、簡単化のために、それらの安定化エネルギーの強さ ϵ_0 を皆同じだと仮定する (黒丸 1 個の安定化エネルギーが ϵ_0)。さらに、残基自身が天然状態になるとき 64 個、およびボンドで直接結合した隣接残基対がともに天然状態のとき 63 個の安定化エネルギーを獲得するので、それも ϵ_0 で表すと、 α/β 型と R 型タンパク質の安定化エネルギーは合計 $208\epsilon_0$ ($\epsilon_0 < 0$) であり、棒状ヘリックスは遠距離相互作用が存在しない分小さく $188\epsilon_0$ である。タンパク質の構造変化が起きている場合でも、配列上離れた 2 つの残基が連続した天然型のボンドで連結されていれば、その残基対間の特異的相互作用は保持されている。天然構造を保持している格子点の塊を「島」と呼ぶことにする。島内のある格子点でボンドが非天然

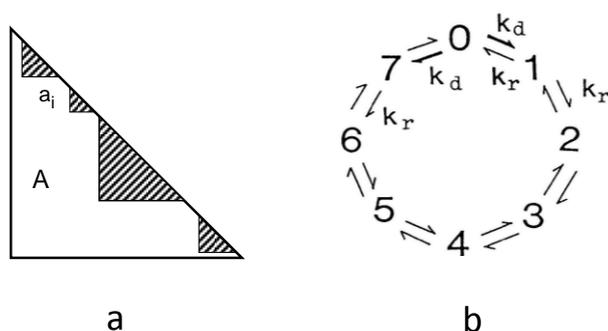


図 3-5 (a) 島模型タンパク質の島 (斜線部) の分布。A は三角マップ全体の面積、 a_i は島の面積を表す。(b) 格子点のサブステート : 0 が天然型、1~7 が非天然型のサブステートである。

型になると、その両側に分かれた格子点間の特異的相互作用は失われる。そのため、天然構造の島が非天然型の格子点の挿入によって 2 つの小さな島に分割される。いくつかの格子点において非天然型になったタンパク質は、図 3-5a に示されるように小さな島 (斜線部) の集合となる。島の内部に残った黒丸は残基間の特異的相互作用として保持されるが、島の外になってしまった

黒丸は特異的相互作用を失う。これが島模型タンパク質と呼ばれる所以である。

格子点におけるボンドの連結状態には8つのサブステートがあると仮定した。0を天然型サブステートとし、残りは非天然型とする。このように定義すると、島模型タンパク質の構造は64個の8進数の集合となり、例えば464300005600000761.....00446のように表現できる。0が連続する部分が天然構造の島である。サブステートは揺らぎによって常に変動するので、その様子を図3-5bのように表した。非天然型サブステート間の遷移確率は常に $k_r = 1/2$ とする。サブステート0から1または7に変化する場合は、天然構造の島を壊す必要があるため、それに必要なエネルギーを $\Delta\varepsilon$ ($\Delta\varepsilon > 0$) とすると、遷移確率は $k_d = (1/2)e^{-\Delta\varepsilon/\theta}$ と表される。ここで、 $\Delta\varepsilon$ は1つの島が2つの島に分割される時失われる特異的相互作用(黒丸)の数に $|\varepsilon_0|$ を掛けたものである。また θ は $k_B T$ に対応する $|\varepsilon_0|$ 単位のパラメータである。 k_d をこのように選ぶことによって、様々なコンフォメーションをとる状態間のボルツマン分布を保証することができる。

3) シミュレーションの結果

上記のような島模型タンパク質の構造変化をモンテカルロ・シミュレーションで実行した。サイコロを振ってランダムに残基番号を選び、その残基のサブステートを両隣のいずれかのサブステートに変化させる。そのさい、0状態を壊すときは上記の $\Delta\varepsilon$ を計算する必要がある。そのような方法をマイクロコンピュータの機械語でプログラミングして、 10^8 から 10^9 ステップのシミュレーションが可能になった ($|\varepsilon_0| = 1024$ として計算)。

(i) 島模型タンパク質の立体構造の揺らぎ

転移温度付近で島模型タンパク質の構造変化をシミュレーションした。島模型タンパク質の構造秩序度を示すオーダーパラメータ(η)として、図3-5aに示された島の面積の和を求め、三角形全体の面積に対する割合を $\eta = \sum_i a_i / A$ として採用した。 $\eta = 1$ のとき完全なN状態、 $\eta = 0$ のとき完全なU状態を表す。横軸をシミュレーションの試行回数にとり、縦軸に η をプロットしたものが図3-6上段の図である。(a)は棒状ヘリックスに対し転移中点温度付近でシミュレーションした結果である。 η は頻繁に変動するが、完全にはN状態にもU状態にも到達しない。時間に対応する横軸のスケールは他の2つの例に比べ1/10から1/20である。遠距離相互作用が機能していない合成ポリペプチドのヘリックス・コイル転移がこの例に対応する。図3-6bは α/β 型タンパク質の転移中点付近での構造の揺らぎである。 η は0と1の間をパルス状に変動して、棒状ヘリックスの場合とは顕著に異なる。すなわち、 α/β 型タンパク質はall-or-noneの典型的な2状態転移である。よく見るとU状態の間に、鎖は頻繁にN状態に向かって巻き戻るが、途中でU状態に引き返す。反対に、N状態に居る間も、頻繁にU状態に向かって鎖はほどけるが、ほどけきれずに再びN状態に戻る。図3-6cはR型タンパク質の結果である。同じく転移中点付近でのシミュレーションであるが、N状態とU状態の平均滞在時間が極端に長い。 α/β 型に比べ、

横軸のスケールは約 10 倍長く、構造転移の協同性が異常に高い事を示している。

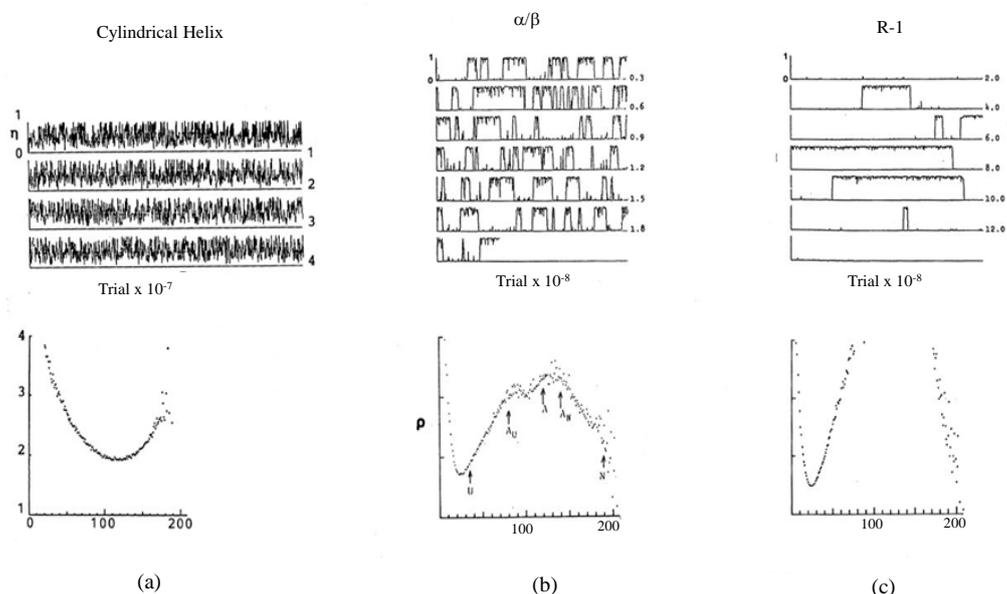


図 3-6 計算機シミュレーションの結果。上段：オーダーパラメータ η の揺らぎ、下段：反応座標に沿う自由エネルギー曲線。(a) 棒状ヘリックス、(b) α/β 型タンパク、(c) R 型タンパク。上段横軸の Trial は経過時間に対応する。下段横軸はタンパク質構造のエネルギーで ϵ_0 単位で測定されている。右端が最もエネルギーが低い状態に対応する。

(ii) 島模型タンパク質は 3 次元立体構造の違いをよく反映している

島模型タンパク質のシミュレーションという方法は、3 次元の格子点上に分布した鎖状タンパク質の立体構造の違いを的確に表現していると考えられる。N 状態にあるタンパク質において隣接する残基間距離の平均値を計算する。R 型タンパク質の平均残基間距離は約 22 残基 (contact order で表すと $22/64=35\%$) であり、 α/β 型の場合は 12 残基 ($co=12/64=19\%$)、棒状ヘリックスでは 4.5 残基 ($co=4.5/64=7\%$) である。格子点を紐でどのように連結するかという鎖のトポロジーの違いが、三角マップ上で遠距離、中距離、短距離相互作用の分布の様子の違いに反映されている。平均残基間距離の大きな R 型タンパク質は、大きな 0 状態の島ができないと十分な安定化エネルギーを獲得できない。大きな島を形成しようとするときエントロピー損失が大きく遷移状態の自由エネルギーが増大し、そのため folding rate は遅くなる。十分な安定化エネルギーが獲得できない小さな秩序構造 (島) はすぐに潰れてしまい立体構造の揺らぎも小さくなる。逆に unfolding のさいには大きな島の遠距離相互作用を壊すために大きなエネルギーを必要とするが、そのようなエネルギーの揺らぎはめったに起きない。すなわち、CO が大きな立体構造のタンパク質は folding rate も unfolding rate も十分遅いという結果になる。つまり、立体構造の違いが平

均残基間距離という形に現れ、それを特異的相互作用の島模型という形でシミュレーションに取り入れることによって、タンパク質の立体構造の動的な揺らぎの違いに現れてくるのである。

(iii) 島模型タンパク質の自由エネルギー曲線

図 3-6 の下段はシミュレーションの間に出現する鎖のコンフォメーションを、その相互作用エネルギー E/ε_0 によって識別し、ある相互作用エネルギーを持つコンフォメーションがシミュレーション中に出現する頻度をカウントして、その対数の逆符号をとってプロットしたものである。すなわち、縦軸はポリペプチド鎖の自由エネルギーに対応するので、鎖の様々なコンフォメーションに対する自由エネルギー曲線である。示した図は転移温度付近の結果をプロットしたものである。棒状ヘリックス (図 3-6a) の場合、 E/ε_0 が 110 付近で自由エネルギー最小となる。温度を低温から高温に変化させると、自由エネルギー最小の位置が E/ε_0 の小さな値の領域 (ヘリックス含量が小さい領域) に連続変化していく。これを連続状態転移といい、タンパク質が示す 2 状態転移とは明確に異なる。 α/β 型あるいは R 型タンパク質の場合、自由エネルギー曲線には 2 つの極小値が存在し、その間には自由エネルギーの高い障壁が存在している (図 3-6b,c)。低温においては、タンパク質は主に N 状態に分布するが、高温になって N 状態のポピュレーションが減少するにつれて、その分 U 状態のポピュレーションが増大し、転移中点温度では N と U 状態のポピュレーションが等しくなり、さらに高温になると U 状態が主となる。どの温度においても常に N か U のどちらかの状態に分布して、途中の状態は常に実現確率が低いというのが 2 状態転移の特徴である。図 3-6b に示された α/β 型タンパク質の場合、自由エネルギー曲線の 2 つの極小点間のエネルギー差 $\Delta E = E_U - E_N$ は $-156\varepsilon_0$ ($\varepsilon_0 < 0$) であった。この値は、いわゆる unfolding の反応エンタルピー ΔH_{uf} に相当する。

棒状ヘリックスのように空間的な折りたたみ構造を持たない場合は、連続状態転移となるため、転移中点温度付近になると鎖状高分子はヘリックスとコイルが混在した状態になる。一方、空間的折りたたみ構造を持つ α/β 型や R 型タンパク質の場合は、N か U かという典型的 2 状態転移を示すが、その揺らぎの様子は顕著に異なる。 α/β 型の場合は、4 つのよりコンパクトな構築単位に区分されているため、2 状態転移の協同性 (cooperative unit) が比較的小さく、N あるいは U 状態の平均滞在時間が比較的短い。一方、R 型のように 64 の格子点全体が cooperative unit の場合は、構造転移の協同性が非常に高く、壊れにくい、一旦壊れると今度はなかなか巻き戻らないということが起き、これは必ずしも利点とは限らない。現実には分子量が巨大なタンパク質の場合、小さな構造構築単位に区分されていないと、構造形成に時間がかかりすぎて不都合が生じたり、構造をほどくために時間がかかりすぎたりという問題が起きてくる。

(iv) folding 反応経路と unfolding 反応経路

転移中点温度においてシミュレーションを実行すると、タンパク質は folding と unfolding 転

移を繰り返す。Folding 過程の間に、鎖にどのような構造変化が起きたのかを追跡するため、64 個の格子点の両端の計 9 個の格子点を除いた、残り 55 個のユニットを 11 残基毎に A~E のグループに分類して名前を付け、どのグループから順に folding が進行したかを記録して解析した。

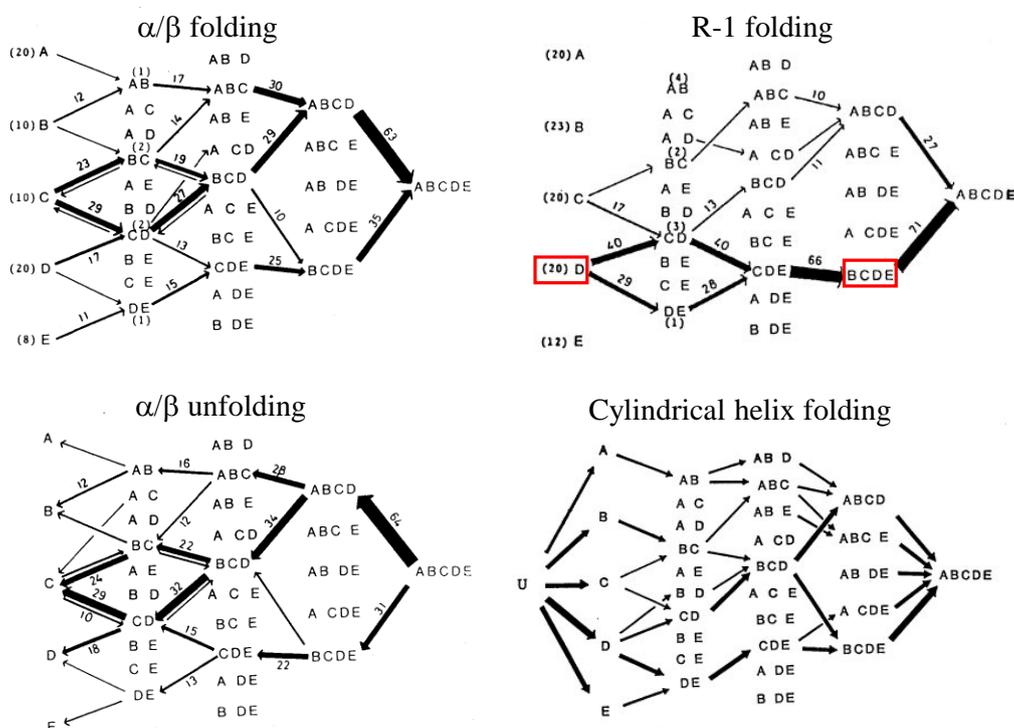


図 3-7 模型タンパク質の folding-unfolding 反応経路。folding or unfolding 反応が完成した場合のみ、経路の解析が行われている。経路の線の太さはその経路を経由する確率を表し、添字の数値はその%を表す。上段左と下段左は α/β 型タンパク質の folding 経路と unfolding 経路であるが、反応経路は経路の線の太さも含めて非常によく似ていて、丁度逆経路を辿って反応が進行することを示している。本文説明参照。

注意すべき点は、folding が完成した場合だけ経路の解析が行われている点である。つまり、途中で引き返したような場合の構造の揺らぎは対象外である。 α/β 型タンパク質に対して追跡した結果を示したものが、図 3-7 の左上である。一方、R 型タンパク質と棒状ヘリックスに対する折りたたみ反応経路がそれぞれ図 3-7 の右上と右下の図である。一方、左下の図は、同じく転移中点温度付近で、 α/β 型タンパク質の unfolding 経路を記録した結果である。folding にも unfolding にも複数の反応経路が存在するが、 α/β 型や R 型タンパク質の場合には、実現確率が最も高い反応経路が存在するという事実は注目に値する。また folding 反応の開始部位にも、最も確率の高い場所が存在する。例えば α/β 型の場合は C サイトから折りたたみ反応が始まる。一方、棒状ヘリックスの場合は、そのような最大確率の反応経路が見当たらない。ヘリックス上

のどの場所からでも同様に構造形成が始まる。また必ずしも連続した島の形成を経由しないで、例えば B_D や AB_D という離れ島から構成された中間体を経由して folding することも起きている（図 3-7 の右下図参照）。これらの事実は、棒状ヘリックスの折りたたみ反応は 2 次元ジグソーパズルで、タンパク質の折りたたみ反応は 3 次元のジグソーパズルであるという「たとえ」を裏付ける結果である。タンパク質の立体構造形成の協同性と折りたたみ反応経路との関係を考察してみると、協同性が高くなるにつれて、折りたたみ反応経路が明確に一本道となる傾向が強いことが分かる。実際、 α/β 型の反応経路に比べ R 型タンパク質の反応経路は「一本道」に近い。折りたたみ反応は「めったに起きない稀な現象」であり、整合性のある限られたいくつもの現象が同期して起きたときにのみ起きる現象である。その事が、「相互作用の協同性が強くなるにつれて一層反応経路が狭く絞り込まれる」理由である。

最後に、もう一つ興味ある結果が得られた。unfolding 反応経路は folding 反応経路の逆を辿っていることが分かる。 α/β 型タンパク質の例が図 3-7 の左の上下図に示されているが、反応経路が選択される確率分布まで含めて、まさに逆過程を辿ることが分かった。その状況は、R 型タンパク質の場合も全く同じである。この事実は、unfolding 反応の入り口が狭く限定されており、逆に folding 反応の入り口もまた同様に狭く絞り込まれていることを示唆している。この状況は「寄木細工のジグソーパズル」を壊したり、組み立てたりする様子を考えると分かり易い。一旦、崩したブロックを再び組み立てようとする時、形を崩したとき最後に残ったブロックを最初の核に選んで再構築作業を開始するのではないか。つまり、folding 反応の入口は unfolding 反応の出口に対応していて、その逆も成り立つ。その結果、folding と unfolding は同じ道を逆にたどる現象なのではないだろうか。

(v) folding-unfolding の反応速度定数の温度依存性と遷移状態仮説

タンパク質の folding-unfolding 速度定数の温度依存性は、反応の動的過程を考察するために重要な観測データである。 α/β 型タンパク質の folding 反応の速度定数を求めるために、初期状態を 44...4 として毎回異なった乱数列を用いてモンテカルロ・シミュレーションを繰り返し、 η の時間変化を図示すると図 3-8 左図のようになった。転移中点温度の付近では、反応が完成する事象間の平均滞在時間を測定し、その逆数を速度定数として採用した。folding し始めてから完了するまでの時間は一般に短い、folding 現象が始まるまでの時間は毎回異なっている。folding が完成する場合、 η の値は順調に増大して途中で引き返すことが少ないことは注目に値する。 η の時間変化曲線を積算すると指数関数的な曲線が得られ、それから folding 速度定数 k_f を求めた。unfolding の速度定数 k_{uf} も同様の方法で求まる。Arrhenius Plot に対応するものを描くために横軸に $1/\theta$ をとり、縦軸に $\ln k_f$ および $\ln k_{uf}$ をプロットした（図 3-8 右図）。高温では unfolding 速度が速くなり、低温で folding 速度が速くなる。図中には α/β 型や R 型タンパク質の速度定数がプロットされているが、転移温度はほぼ同じであるのに対し、速度定数が顕著に異なっていて、

相互作用の協同性の範囲 (cooperative unit) が大きくなるに従って速度が遅くなる。

反応速度定数を遷移状態理論にしたがって考察すれば、このプロットの接線の勾配は、いわゆる活性化エンタルピー ΔH^\ddagger を用いて $-\Delta H^\ddagger/R$ と表される。図 3-8 から α/β 型タンパク質に対して得られた活性化エンタルピーは、 $\Delta H_{uf}^\ddagger = -70\epsilon_0$ 、 $\Delta H_f^\ddagger = 85\epsilon_0$ であった。計算機シミュレーションでは、平衡定数 K_{uf} を一切考慮することなく、unfolding 反応と folding 反応を独立にシミュレーションして k_{uf} と k_f を求めているが、熱力学的なパラメータに対して得られた結果は

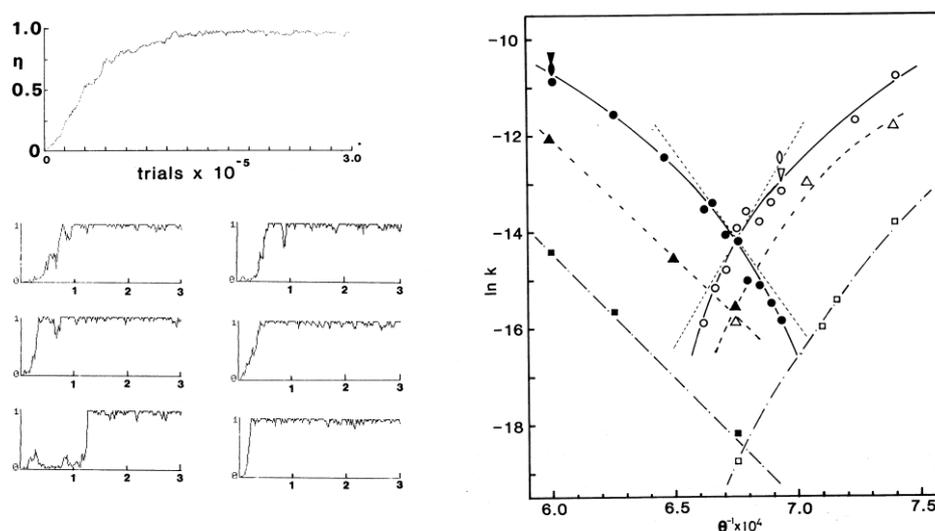


図 3-8 folding 過程と速度定数の Arrhenius plot。左図は α/β 型タンパクの温度 $\theta = 1350$ における folding 反応の素過程を表す。シミュレーションを始めてから folding が成功するまでの事象を記録している。左上の図は、16 回の素過程を積算したもので、指数関数曲線で近似できる。すなわち、folding という現象は典型的なポアソン過程である。folding が成功するときは、その途中で η が減少することはめったに起きていない。つまり、 $U \rightarrow N$ 転移は一気に起きる現象であることを示唆している。右図は速度定数の Arrhenius plot。□ : R-1 型タンパク、△ : R-2 型タンパク (cooperative unit の大きさが R-1 の半分)、○ : α/β 型タンパク。

非常に興味深い。すなわち、反応速度の解析から $\Delta H_{uf}^\ddagger - \Delta H_f^\ddagger = -155\epsilon_0$ となるが、この値は、図 3-6b の自由エネルギー曲線の解析から得られた $\Delta H_{uf} = -156\epsilon_0$ とぴったり一致した。速度論的解析によって得られたパラメータが $\Delta H_{uf}^\ddagger - \Delta H_f^\ddagger = \Delta H_{uf}$ を満足することは、N と U 状態の間に仮想的な遷移状態 (A 状態) が存在して、反応速度定数に「遷移状態仮説」が成りたっていることを示唆している。そしてこの仮想的な A 状態は unfolding でも folding でも同じ状態に対応しているということになる。 $\Delta H_{uf}^\ddagger = -70\epsilon_0$ 、 $\Delta H_f^\ddagger = 85\epsilon_0$ という値から、自由エネルギー曲線上の遷移状態 A の位置を求めると、丁度、自由エネルギー曲線の頂上付近であることが分かる。つまり、遷移状態が自由エネルギー曲線の頂上にあつて、その仮想的な遷移状態と N 状態あるいは

U 状態のあいだに熱平衡が成りたっていて、A 状態からどちらかの方向に一步進むと一気に反応が進行して、**unfolding** あるいは **folding** 反応が完結することを意味している。しかし、計算機シミュレーションが示唆するタンパク質の「遷移状態」は **folding-unfolding** の反応速度定数を解析するためだけの仮想的なものではなく、自由エネルギー曲線（揺らぎによるあらゆる構造の出現頻度を考慮）の頂上に存在する現実の熱平衡状態である。つまり、初期状態から遷移状態に移行するまでの現象は熱平衡分布を十分満たしながら経由する揺らぎの過程であり、一旦、遷移状態を過ぎると一気に終状態に向かう過程であることを意味している。この結論は、格子模型タンパク質のシミュレーション結果に対して証明されたものであるが、実物のタンパク質に対しても成り立つ理論ではないだろうか。R 型タンパクの場合も N 状態と U 状態間のエネルギー差は α/β 型のタンパク質とほぼ同じである。従って、遷移状態もエネルギー的には同程度だと考えられるが、その自由エネルギー障壁は異常に高い。その理由は **contact order** の違いにある。すなわち、数箇所の残基が非天然状態になるだけで相互作用エネルギーは大きく失われるが、その状態のエントロピーはさして増大しないままなので自由エネルギーが非常に大きくなる。つまり、自由エネルギー障壁が異常に高い状態になるからである。これが島模型タンパク質タンパク質の計算機シミュレーションに対して得られた結果である。

実際のタンパク質に対しても、N 状態から A 状態に一気に遷移するという事は考えにくい。同様に U 状態から一気に A 状態に遷移することもないだろう。途中には、沢山の反応中間体が存在して、それらの間の反応素過程を経て $N \rightarrow A$ あるいは $U \rightarrow A$ の状態変化が起きているはずである。そのような反応素過程を陽に考えて、**unfolding, folding** 反応の速度定数を考察するとどうなるのだろうか。そのような問題は次章の§11-3 で考察する。

§11 折りたたみ反応の速度論的観測

1) 折りたたみ中間体としてのモルテングロビュールとは

タンパク質の折りたたみ反応を研究する目的は反応の途中経過を観測することであった。しかし、この反応は2状態性が強く、最新の分光学的な方法を駆使しても反応中間体を検出することには成功していない。小さな球状タンパク質の折りたたみ反応は2状態変化である。ただし、高濃度の変性剤で強く変性した状態から、急速に変性剤濃度を薄めてタンパク質の folding 反応を開始させると、開始直後にランダムコイル (RC) に近い完全変性状態から急速に 222nm 近傍の負の CD スペクトルが増大するので、その初期状態をモルテングロビュール (MG) と称し、この状態を折りたたみ反応の中間体であると報告する研究が多数発表されてきた。確かに、高濃度変性剤存在下での完全変性状態から MG 状態に変化し、最終的に天然状態 (N 状態) に変化するという意味では、折りたたみ反応の中間状態であるが、MG をポリペプチド鎖が N 状態に至る途中の反応中間体と解釈するには少し問題がある。なぜなら、RC に近い完全変性状態は高濃度変性剤存在下で実現する変性状態であり、溶媒が天然条件に戻された直後のタンパク質変性状態が MG ではないだろうか。つまり、MG は中間状態ではなくヘリックス含量が増大した折りたたみ反応の開始状態だと考えられるからである。

MG 状態は弱い変性条件下 (例えば酸変性条件) において、平衡状態としても観測される。その構造はペプチド鎖上に部分的な2次構造 (ヘリックス) と無秩序鎖が混在する状態で、部分的2次構造の部位は持続的に維持されてはいない。溶媒条件の変化によって MG 状態の秩序構造部分が徐々に増大する過程は、ヘリックス-コイル転移のように、ヘリックス含量が徐々に増加する連続状態転移である。

変性剤濃度ジャンプによる Folding 実験の初期に観測される MG への状態変化は高濃度変性剤存在下の完全変性状態から天然の溶媒条件下における変性状態への過渡的状态変化であって、折りたたみ反応とは呼べないのではないだろうか。事実、 β -ラクトグロブリン (天然状態は全て β シート構造からなるタンパク質) の折りたたみ反応初期過程において α ヘリックス含量が一時的に増大する現象が観測されている。つまり、こ

のタンパク質の MG 状態は非天然の構造であり、折りたたみ反応の進行途中に現れる中間体と考えることは出来ない。222nm 近傍の CD スペクトル変化によって観測される非持続的な部分構造形成は貧溶媒下で観測される非天然状態の象徴ではないだろうか。

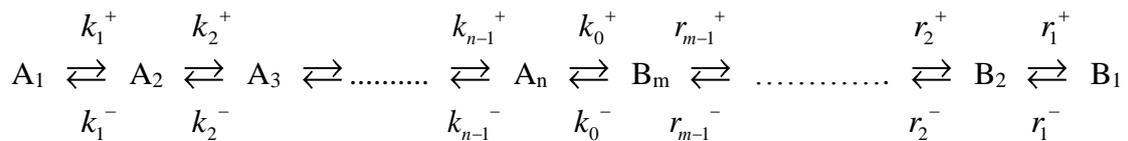
2) 2 状態転移なのに「折りたたみ反応経路」を問うことは可能か？

溶媒条件を急速に天然状態に戻したときの Folding 反応の初期状態を反応中間体と呼ぶべきかどうかの議論は別にして、その初期状態を U 状態と呼ぶことにする。U から N への構造変化は 2 状態変化なので中間体を検出することは基本的に不可能である。折りたたみ反応中間体を検出できないのに「折りたたみ反応経路」を問うこと自体意味のあることなのだろうかという疑問がわく。しかし、前章の「格子模型タンパク質の計算機実験」の結果は、タンパク質の特異的相互作用の協同性が強いほど N-U 転移の 2 状態性は顕著になるが、「折りたたみ反応経路」は一層明確になるということを示していた。unfolding 反応の開始部位が folding 反応の最終部位に相当し、その逆も成立し、反応経路の入口、出口が厳しく限定されているからである。その途中にある遷移状態の情報が分かれば、経路は相当明確になる。遷移状態に関する情報は反応速度定数を解析すれば得られる。遷移状態仮説による反応速度定数の解析について考察してみよう。

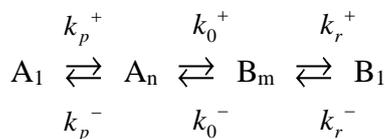
3) 反応素過程の定常流近似と遷移状態

化学反応は反応物と生成物間の速度定数を用いて解析される。タンパク質の折りたたみ反応のように、N 状態と U 状態間の 2 状態転移の場合、反応式は最も簡単に表され、 $N \rightarrow U$ 過程の速度定数 k_{uf} 、 $N \leftarrow U$ 過程の速度定数 k_f は実験から簡単に求めることができる。化学反応式を微分方程式で表して解くと、U 状態も N 状態もその濃度の時間変化は単一の時定数 $\tau = (k_f + k_{uf})^{-1}$ の指数関数で与えられる。従って、N 状態（あるいは U 状態）にあるタンパク質の量を分光学的に観測すれば、測定された時定数 τ と平衡定数 $K_{uf} = k_{uf}/k_f$ から、速度定数の値 k_f 、 k_{uf} を簡単に決めることができる。しかし、本当に N と U の 2 つの状態しか存在しないのであれば、折りたたみ反応の経路も何も存在しなくて、ただ N と U 状態の間をジャンプするだけである。しかし、計算機シミュレーションで考察したように、タンパク質の鎖は初期状態から遷移状態に至るまでの過程で数多くの反応素過程を経て N から U へ、あるいは U から N へ構造変化する。

その際、途中に存在する遷移状態を過ぎると一気に終状態に至ることが分かった。この事実を十分考慮する必要がある。「反応経路」は初期状態から遷移状態に至るまでの平衡状態間の揺らぎを考察することによって得られるのではないだろうか。実験的観測によってはNとUしか検出できなくて、反応経路上のどんな中間体も観測にかからないが、 k_f と k_{uf} という2つの速度定数が得られる。 k_f という情報はU状態から遷移状態(A状態)に至るまでの中間体の平衡論的揺らぎを反映している。同様に、 k_{uf} はN状態からA状態までの中間体の平衡論的揺らぎを反映している。反応素過程が k_f と k_{uf} に与える影響を考察しよう。反応素過程に関与している反応中間体の濃度はどれも時間的に滞ることなく定常的に流れているので、初期状態から終状態への時間変化を表す緩和曲線は典型的な単一の指数関数で表され、実験から得られる情報は、 k_f と k_{uf} という2つの速度定数だけである。それだけで、どうして反応経路に関する情報を得られるのか、もう少し詳しく考察しよう。沢山の反応素過程が関与しているので、それを次式



のように表す。2状態性を考慮すると、中間生成物 $A_i (i=2 \sim n)$ は i が増大するごとにポピュレーションが小さくなるので、 $k_i^+ \ll k_i^-$ が成りたっている。同様に、 $B_j (j=2 \sim m)$ に関しても素過程の速度定数に対し $r_j^+ \gg r_j^-$ が成りたつ。つまり、 A_n と B_m が自由エネルギー分布曲線の頂上に位置している。さらに、中間体の濃度は常に一定であるという定常流条件： $dA_i/dt=0$ 、 $dB_j/dt=0$ を付けると、上記反応式は、厳密に解くことが出来て見かけの速度定数を用いて、下記のように表すことができる。



計算の詳細は省くが、見かけの速度定数は $k_p^+ = k_{n-1}^+ \cdot K_1 K_2 \cdots K_{n-2}$ 、 $k_p^- = k_{n-1}^-$ と表される。ただし、 $K_i = k_i^+ / k_i^-$ は各素過程の平衡定数である。同様に B_j 側の中間体に対しても、 $k_r^+ = r_{m-1}^+$ 、 $k_r^- = r_{m-1}^- \cdot K'_1 K'_2 \cdots K'_{m-2}$ 、 $K'_j = r_j^- / r_j^+$ が成りたつ。さらに、 A_n 、 B_m という中間体に対しても定常流近似を適用して、反応式を2状態近似に書き直すと、 $A_1 \rightleftharpoons B_1$ として、 $A_1 \rightarrow B_1$ の見かけの速度定数が $k_p = k_0^+ \cdot K_{An-A1}$ であり、 $A_1 \leftarrow B_1$ の見かけの速度定数が $k_r = k_0^- \cdot K_{Bm-B1}$ となる。ここで、 K_{An-A1} は A_n 状態と A_1 状態間の平衡定数で

$K_{A_n-A_1} = [A_n]/[A_1] = K_1 K_2 \cdots K_{n-1}$ である。同様に、 $K_{B_m-B_1}$ は B_m 状態と B_1 状態間の平衡定数で、 $K_{B_m-B_1} = [B_m]/[B_1] = K'_1 K'_2 \cdots K'_{m-1}$ が成り立つ。 A_n 状態と B_m 状態をまとめて A 状態と表すと、 $k_p = k_0^+ \cdot K_{A-A_1}$ 、 $k_r = k_0^- \cdot K_{A-B_1}$ となる。この式は、仮想的な活性化状態 A を想定して、速度定数を定義する絶対反応速度論の式と同じ形式になっている。以上の定常流仮定による解析は、多数の素反応過程から成る化学反応を 2 状態反応に近似することに成功している。A 状態を遷移状態と名付け、これを遷移状態仮説という。

4) 折りたたみ反応の遷移状態仮説

A_1 を U 状態、 B_1 を N 状態とすれば、 $k_p = k_f$ 、 $k_r = k_{uf}$ に対応し、遷移状態を A と表すと、 $k_f = k_0^+ K_{A-U}$ 、 $k_{uf} = k_0^- K_{A-N}$ となる。折りたたみ反応経路を探る観点から、この反応速度の式の意味を考察しよう。A 状態はタンパク質の折りたたみ反応の自由エネルギー曲線の頂上に位置し、N 状態と U 状態の分岐点である。計算機シミュレーションでもみたように、N 状態にあるタンパク質の構造は揺らぎ、オーダーパラメータ η はしばしば限界まで減少するが、大抵はもとの N 状態に戻る。反対に U 状態にあるときも η の値はしばしば回復するが、それ以上構造が回復することはなくて、もとの U 状態に戻る。その中で、たまたま A 状態に到達することがある。速度定数 k_0^+ で A 状態を超えると構造は一気に N 状態に転移する。同様に A 状態から k_0^- で U 状態側へ移動すると一気に U 状態への転移が完結する。その結果、 $k_f = k_0^+ K_{A-U}$ 、 $k_{uf} = k_0^- K_{A-N}$ という式が成り立つ。このとき重要なのは、 K_{A-U} 、 K_{A-N} が、多くの反応素過程上の各中間体にタンパク質分子が平衡分布したときの A と U 状態、あるいは A と N 状態の化学平衡定数と考えてよいということである。従って、観測された速度定数の温度依存性を考えると、平衡定数の温度依存性を知ることができる。ただし、 k_0^+ 、 k_0^- の温度依存性は平衡定数の温度依存性に比べて十分小さいと仮定できるとしている。 K_{A-U} の温度依存性から folding の活性化エンタルピー ΔH_f^\ddagger が得られ、 K_{A-N} の温度依存性から unfolding の活性化エンタルピー ΔH_{uf}^\ddagger が得られるが、 ΔH_f^\ddagger は平衡状態 A と U のエンタルピー差に等しく、 ΔH_{uf}^\ddagger は平衡状態 A と N のエンタルピー差に等しい。今後、 ΔH_{uf}^\ddagger 、 ΔH_f^\ddagger と表記するがそれは平衡状態の熱力学量の差であるということを強調しておきたい。この結果、 ΔH_{uf}^\ddagger 、 ΔH_f^\ddagger の測定値から遷移状態 A の熱力学量を知ることができ、それは折りたたみ反応経路上にある遷移状態の構造を考察する上で重要な情報となる。

5) 遷移状態は折りたたみ反応経路のボトルネック

U 状態にあるポリペプチド鎖は何度も秩序構造を回復して天然状態に巻き戻ろうと試みる。しかし、ほとんどの場合、何らかの障害に妨げられて N 状態には到達できずに元の U 状態に戻る。通常はその繰り返しであるが、時折あつけないほど容易に天然状態に至ることが起きる。そのとき通る状態が遷移状態である。折りたたみ反応が成功するときのみ通過するボトルネックの分岐点である。折りたたみ反応の速度定数は、そのボトルネックを通過するときの遷移状態の情報を与えている。折りたたみ反応経路を知るためには、反応が成功するとき通過するポリペプチド鎖の構造情報が重要な鍵となる。そのとき通過する反応経路の入口はどこでもよいわけではない、出口にも強い制限が課されているだろう。そして何より経路のボトルネックとなっている遷移状態の構造的性質を明確にすることができれば反応経路を知る重要な情報になるだろう。 k_f 、 k_{uf} という速度定数の解析がその情報をもたらす。以下ではそれを考察してみよう。

§12 反応速度定数のアレニウスプロット

1) 遷移状態仮説による反応速度の解析：Dry Molten Globule とは

リゾチームの folding 反応速度 k_f 、unfolding 反応速度 k_{uf} を遷移状態仮説のもとで解析しよう。図 4-1 は天然リゾチームを、いろいろな濃度のグアニジン塩酸塩(GuHCl)が存在する溶液のもとで温度ジャンプ法によって folding あるいは unfolding 反応の速度定数を測定したものである。速度定数の対数 ($\ln k$) を $1/T$ に対してプロットしたものを Arrhenius plot と呼ぶ。 $\ln k_{uf}$ の接線の勾配からは ΔH_{uf}^\ddagger 、 $\ln k_f$ のそれからは ΔH_f^\ddagger が求まる。図 4-1 に示したように、 $\ln k_{uf}$ のグラフは直線であるが、 $\ln k_f$ のグラフは大きく湾曲している。接線の勾配を考えると、 ΔH_{uf}^\ddagger は温度に依存せず常に一定の値をとっている。一方、 ΔH_f^\ddagger は低温領域では正の値をとるが、温度が上がるにつれてその値は減少し、高温領域では負の値となる。平衡状態間の反応エンタルピーに対して、両状態間の定圧比熱の差を ΔC_p と表すと、 $\partial(\Delta H)/\partial T = \Delta C_p$ という熱力学的な関係式が成り立つ。そのことを考慮すると、 $\partial(\Delta H_f^\ddagger)/\partial T = \Delta C_{p,f}^\ddagger$ は A 状態と U 状態間の比熱の差を表すと考えてよい。 $\Delta C_{p,f}^\ddagger = -6.7 \text{ kJ/mol}$ として ΔH_f^\ddagger の温度依存性を計算してグラフに表したものが、図 4-1 に示された $\ln k_f$ の最適曲線である。一方、 $\ln k_{uf}$ のグラフが直

線であることから $\Delta C_{p,uf}^\ddagger = 0$ であることは明らかである。

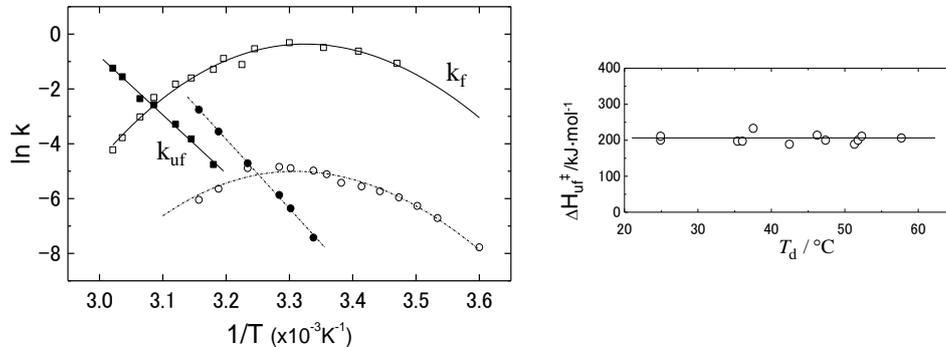


図 4-1 リゾチーム折りたたみ反応の速度論的データ。左： k_f と k_{uf} の Arrhenius plot。GuHCl 濃度 (□) 0.7 M、(○) 2.4 M。ln k_{uf} は直線に乗っているが、ln k_f は大きく湾曲している。接線の勾配がエンタルピー変化を表しているので、 ΔH_{uf}^\ddagger は温度に依らない一定値である。一方、 ΔH_f^\ddagger は温度の上昇とともに値が減少して、正から負に変化する。最適曲線は $\Delta C_{p,f}^\ddagger = -6.7$ kJ/mol で得られた。右：様々な変性剤濃度条件下の温度ジャンプ法によって決定された ΔH_{uf}^\ddagger 。転移温度 T_d の広い範囲で ΔH_{uf}^\ddagger は約 200 kJ/mol に等しく、温度にも変性剤濃度にも依存しない。

タンパク質の変性に関する熱力学的研究は Privalov らによって広範囲にわたって詳しく行われてきた。多くのタンパク質に対して、その変性熱 ΔH (unfolding enthalpy) を変性中点温度に対してプロットすると、ほぼ直線的に増加する。その勾配が U 状態と N 状態の間の定圧比熱の差 ΔC_p である。それは、タンパク質内部に埋もれていた疎水性残基が Unfolding に伴って溶媒中に露出してくることによって、タンパク質溶液の比熱が増大するからである。この結論は、多くのタンパク質に対する熱測定の研究から確かめられていて、疎水性残基に富むタンパク質に対しては ΔC_p の値が大きくなる。速度論的に得られた遷移状態の比熱に対しても同様に考えると、 $\Delta C_{p,uf}^\ddagger$ がほぼゼロであるということは、A 状態の比熱が N 状態と同じであることを意味している。図 4-1 の右図は、広い温度範囲に渡って ΔH_{uf}^\ddagger が約 200 kJ/mol であることを示している。大きなエンタルピー増加はタンパク質内の特異的相互作用の崩壊を意味しているが、 $\Delta C_{p,uf}^\ddagger \approx 0$ はタンパク質内部への水の浸入がほとんど起きていないことを示唆している。つまり、N 状態から構造の揺らぎが起きて A 状態に達しても、タンパク質の構造は見かけ上 N 状態に非常に近いと考えられる。しかし、分岐点である A 状態を一步で

も過ぎると、水分子の浸入が一気に始まってタンパク質は U 状態に変化する。タンパク質の **Unfolding** の前半は水素結合を含む特異的相互作用の崩壊であり、それによって多少の鎖のエントロピー増加は起きているであろうが、まだ水の浸入を許すほどの構造変化は起きていない。後半はタンパク質内部への水の浸入である。Privalov は、このような遷移状態の特徴を「**Dry Molten Globule**」と表現した。

2) 部位特異的アミノ酸置換が折りたたみ反応速度に与える影響

天然のリゾチームは 4 本の **SS** 結合を保持しているが (図 4-2 のリボン図参照)、瀬川らは、そのうち特定の 1 本の **SS** 結合を欠損させた 4 種のリゾチーム **3SS** 変異体を作製し、タンパク質の折りたたみ反応経路上の遷移状態を調べるために、**SS** 結合欠損

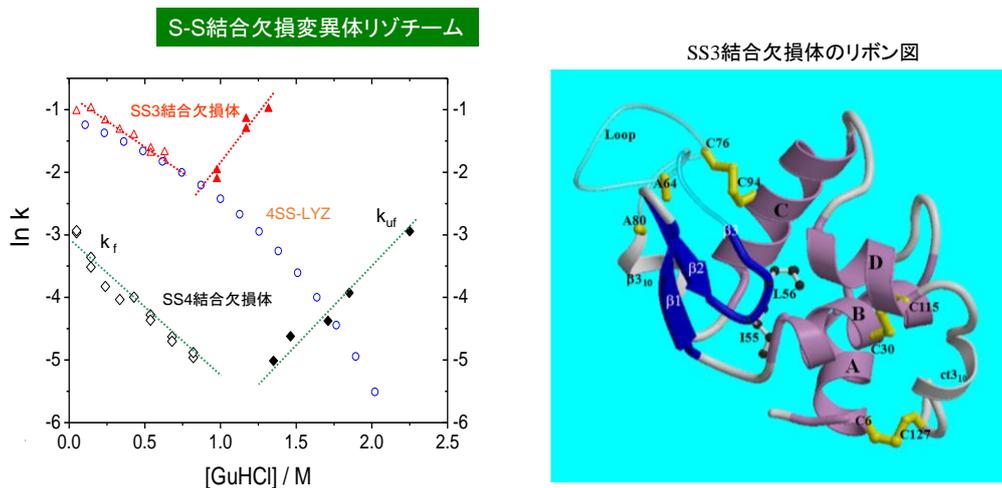


図 4-2 リゾチームの **SS** 結合欠損変異体の折りたたみ反応。左：速度論的研究結果 (本文中の説明参照)。右：**SS3** 結合欠損体のリボン図。**SS1**~**SS4** とは、**SS1**(Cys6-Cys127)、**SS2**(Cys30-Cys115)、**SS3**(Cys64-Cys80)、**SS4**(Cys76-Cys94)という **SS** 結合の略称である。図中の **4SS-LYZ** とは天然リゾチームのデータを表す。**SS3** 結合と **SS4** 結合はリゾチーム分子の β ドメイン内のよく似た位置に存在する 2 本の **SS** 結合であるが、立体構造維持における役割は大きく異なっていた。

変異体を用いて様々な実験を行ってきた。図 4-2 は **Folding-Unfolding** 反応の速度定数に対する影響を調べたものである。リボン図に示されているように、4 本の **SS** 結合は、Cys6-Cys127 (**SS1** 結合と略称)、Cys30-Cys115 (**SS2** 結合)、Cys64-Cys80 (**SS3** 結合)、Cys76-Cys94 (**SS4** 結合) である。折りたたみ反応速度に顕著な変化が現れるのは、**SS3** 結合欠損体と **SS4** 結合欠損体である。 $\ln k_f$ の図において、**4SS-LYZ** と表された曲線に

浴う青丸は天然リゾチームと同じ4SS体のfolding rateを表している。SS3結合欠損体の顕著な特徴は、folding rateが天然4SS体とほぼ同じなのに、unfolding rateが3SS変異体の中で最も速いことである(4SS体のunfolding rateは十分遅くて図中に表せない)。SS4結合欠損体は、それに反して、folding rateが4SS体やSS3結合欠損体に比べ顕著に遅く、unfolding rateはSS3結合欠損体に比べ十分に遅い(安定である)ことが分かる。SS1結合欠損体とSS2結合欠損体の特徴は、その中間で、SS3結合欠損体に近い特徴を示す。この実験結果は、折りたたみ反応の遷移状態に関してどんな情報を与えてくれるのだろうか。SS結合が欠損した部位の近傍は構造自由度が増してエントロピーが増加しているだろう。そのエントロピー増加分が、U状態でもA状態でも同程度であれば、folding rateはSS結合欠損の影響をほとんど受けない。つまり、folding rateは3SS変異体でも4SS体でも変わらないという結果になる。SS3結合欠損体はその典型的な例である。すなわち、遷移状態におけるSS3結合近傍の構造はU状態のものに近いといえる。一方、SS4結合欠損体の場合、U状態においてSS4結合近傍のエントロピーは増大しているが、遷移状態になると、そのSS結合欠損によるエントロピー増大分が打ち消されているため、遷移状態の自由エネルギー障壁が増大してfolding rateが顕著に遅くなっていると考えられる。つまり、遷移状態におけるSS4結合近傍の構造はN状態に近く秩序化されているといえるだろう。そのため、SS4結合欠損体の場合は、SS結合が欠損しているにもかかわらず遷移状態の自由エネルギー障壁は高く維持されているため、unfolding rateの増大は抑えられているのである。他の3SS変異体の場合は、遷移状態においてそれぞれのSS結合近傍の構造がU状態のように秩序を失っているため、unfolding rateの増大が顕著なのである。

以上は、特定のアミノ酸置換がfolding-unfolding反応の速度定数に及ぼす影響を評価して遷移状態の構造を考察したものであるが、タンパク質の立体構造の揺らぎ(柔らかさ)を、アミノ酸残基レベルの分解能で直接観測することによって研究することもできる。上記のリゾチーム3SS変異体の遷移状態に対して、速度論的な研究から得た情報は、その水素・重水素交換反応をNMR分光法によって研究した結果と首尾一貫していた。それは、タンパク質のNMR分光法を学んでから述べることにしよう。

第5章 タンパク質の構造と NMR 分光法

タンパク質の構造は X 線構造解析によって詳細に解明されていて、その構造に基づいて、ポリペプチド鎖の折りたたみ反応を考察してきた。しかし、構造変化を実験的に直接観測しようとする結晶構造解析法には弱点がある。水溶液中に遊離した分子の構造を測定することは出来ない。溶液中にある有機分子の構造を原子レベルの分解能で考察するためには NMR 分光法が強力である。しかし、水溶液中のタンパク質の NMR スペクトルを観測するためには種々の困難が立ちだかつていて、1970 年頃まではタンパク質を NMR 分光法で測定しても十分な情報を得ることができなかった。しかし、フーリエ変換 NMR 分光法 (FT-NMR) が開発されて以後、NMR 分光法の進歩には革新的なものがあり、「タンパク質 NMR」と呼べるような独自の観測法が確立してきた。最新の NMR 分光法によるタンパク質の構造変化の観測法について考察しよう。

§13 タンパク質 NMR の基礎

1) タンパク質の構造とプロトンのスピン網

タンパク質は、20 種類のアミノ酸が連結した鎖状高分子である。ポリペプチドの主鎖に沿って NH 基や $C_{\alpha}H$ が分布し、側鎖には、アミノ酸の種類に応じて、 $C_{\beta}H_2$ 、 $C_{\gamma}H_2$ 、あるいは側鎖末端の CH_3 基、芳香環の CH、NH などが存在している。これらの水素原子のプロトン NMR スペクトルはタンパク質の構造変化に敏感で、強力な分光学的研究手段である。特にプロトンはタンパク質全体に網目のように広がっているため、NMR スペクトルの各共鳴線を特定残基の水素原子として同定することができれば、水素原子間の距離情報を基にしてタンパク質全体の立体構造を決めることも可能である。X 線結晶構造解析が水素原子を除く全原子の空間配置からタンパク質の立体構造を決定するのと相補的な関係にある。そのために最も重要な仕事は、プロトン NMR スペクトルのピーク帰属という作業である。129 残基からなるリゾチームというタンパク質の場合、共鳴周波数が識別されて特定残基に同定されたピークの数約 660 である。約 6000 Hz という狭い周波数範囲にこれだけ多数の共鳴線が密集しているので、多くの共鳴線は重なり合って分離することは不可能であった (図 5-1 参照)。その壁に穴を開けたのは、FT-NMR 法の開発とその 2 次元化という偉業である。それが様々な測定プログラムに進化し、さらに ^{13}C や ^{15}N という同位体の核スピンも交えた異種核多次元 NMR 測定プログラムとなって定着し、独自の Protein-NMR という分野として確立してきた。

多数のプロトンの共鳴線が密集したタンパク質 NMR を高分解能で観測するため

には2次元化されたスペクトルを考察することが不可欠である。そのようなNMR測定法を理解するためには、コヒーレンス移行という概念を知る必要があり、スピンの運動を量子力学的に取り扱うことが不可避である。§14でスピン角運動量の運動を考察する。量子力学的なスピンの運動は電子状態の波動関数とは違って、スピン角運動量ベクトル \vec{I} の古典力学的歳差運動とよく対応しているのが直観的に分かり易いものである。最後に、タンパク質の構造解析にとって不可欠の「ピーク帰属」という問題がある。NMRスペクトルから得られた多数の共鳴ピークをタンパク質内の各残基の特定の水素原子に帰属する手続きである。この問題は第6章で、我々が実際に経験してきたタンパク質のデータ解析を具体例として分かり易く紹介しよう。

2) プロトン NMR の基礎用語

(i) 化学シフト

静止磁場 B_0 内に存在するプロトンのLarmor周波数の大きさは $\omega_0 = \gamma B_0$ (γ は磁気角運動量比)と表される。Hz単位の周波数に直すと $\nu_0 = \omega_0/2\pi$ である。 B_0 は永久磁石の磁場の大きさであるが、通常はプロトンの共鳴周波数で磁場の大きさを表すので、今は $\nu_0 = 600$ MHzの磁場 ($B_0 \approx 14$ T) だとして話を進めよう。タンパク質中のプロトンは、水素原子が属している原子団の種類に応じて局所磁場が僅かに異なる。従って、プロトンの共鳴周波数は ν_0 とは僅かに異なる様々な値をとって分布している。適当な標準物質のメチルプロトンのLarmor周波数を ν_{ref} として、観測プロトンのLarmor周波数 ν_{obs} との差をppmという単位を用いて δ と表記する。この値を化学シフトという。

$$\delta = \left[(\nu_{obs} - \nu_{ref}) / \nu_{ref} \right] \times 10^6 \quad (5.1)$$

タンパク質の場合は、通常 $\delta = 0 \sim 10$ ppm程度の値である。

(ii) 非選択的90°パルス

タンパク質のプロトンNMRスペクトルを測定するために、pulse-FT-NMRという方法を用いる。静止磁場 B_0 の方向をz軸とし、単一周波数 ν_0 で振動するラジオ波を矩形パルス(時間幅 Δt_p)にして、xy平面上で振動磁場 B_1 を発生させる。 Δt_p と B_1 が $\gamma B_1 \cdot \Delta t_p = \pi/2$ を満たすように B_1 を決めると、Larmor周波数 ν_0 で歳差運動しているプロトンは振動磁場に完全に共鳴して、核スピンは丁度90°倒れる(パルス幅は10 μ s程

度)。このとき中心周波数 ν_0 から僅かに異なる Larmor 周波数のプロトンもほぼ 90° 倒れる。その理由を説明しよう。タンパク質中のプロトンの Larmor 周波数は 600 MHz 近傍で約 10 ppm の幅をもって分布しているので、中心周波数から ± 3000 Hz の領域に広がっている。ラジオ波の周波数が ν_0 で単一だったとしても、パルス状の波の場合、不確定性関係から $\Delta\nu \cdot \Delta t \approx 1$ となるので、 $\Delta t = 10 \mu s$ のとき、 $\Delta\nu$ は 10^5 Hz の幅を持っている。すなわち、振動磁場のパルスをフーリエ変換してその周波数成分を求めると、600 MHz を中心として $\pm 10^5$ Hz 程度は白色光と同じ平坦な強度分布を示して広がる。従って、 ± 3000 Hz 程度の広がりであれば、どのプロトンも同程度の強度の振動磁場を感受して、それに共鳴して 90° 倒れる。それ故、このようなパルスを非選択的 90° パルスという。白色光の周波数幅を広くするため Δt_p を短くすると、 B_1 を大きくしなければならないので、ラジオ波の強度は強くなり、このようなパルスをハードパルスと呼ぶ。逆に、単一周波数に近いパルスを照射しようと思えば、パルス幅が長くて強度が小さいラジオ波になり、それは選択的 90° パルスとかソフトパルスと呼ばれる。

(iii) アミノ酸残基のプロトンの標準的化学シフト

図 5-1 は軽水 (H_2O) 中で測定されたニワトリ・リゾチームのプロトン NMR スペクトルを示している。アミノ酸残基中の様々な原子団に属するプロトンの化学シフトの値の範囲が横棒で示されている。 δ の値からどんな原子団に属する水素原子なのか判別できて便利である。例えば、2次元の COSY スペクトルにおいて、横軸 (F2 軸) の範囲が 7.0 ~ 9.0 ppm、縦軸 (F1 軸) の範囲が 3.5 ~ 5.5 ppm であったとすると、それはアミノ酸残基内の主鎖 NH と $C_\alpha H$ の交差ピークであると判断できるからである。

軽水中でタンパク質のプロトン NMR スペクトルを測定すると、通常 4.8 ppm 付近に巨大な H_2O のピークが現れて $C_\alpha H$ 領域のスペクトルを検出することは不可能になる。溶媒を重水に変えて実験すると、 H_2O の邪魔がなくなるので $C_\alpha H$ 領域のスペクトル観測は簡単に行える。しかし、主鎖 NH (アミドプロトン) の NMR 信号が重水素交換反応によって急速に消失するため、NH プロトンの観測は困難になる。そこで、図 5-1 のスペクトルを測定するためには、WATERGATE という名前の水消しのための特別なパルスが採用されている。水の共鳴線が消える理由は、磁場勾配パルスの照射という方法によって核スピンの位相を制御し、 H_2O のプロトンは横磁化を消失した状態に

し、タンパク質のプロトンだけは横磁化の位相を揃えて（コヒーレントな状態という）NMR スペクトルが観測できる状態にする。その結果、図 5-1 では 4.8 ppm 近傍の H₂O の共鳴線がほぼ完全に消失している。

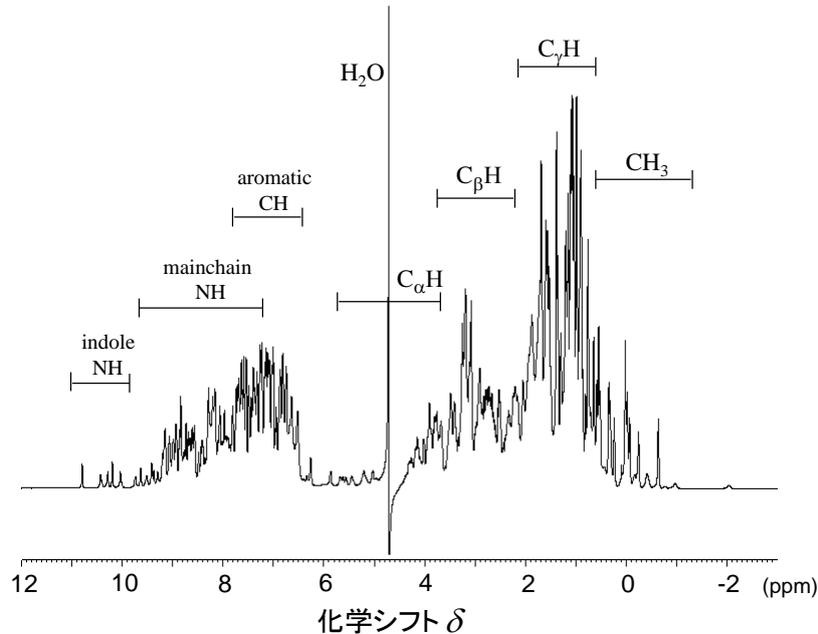


図 5-1 タンパク質の 1 次元プロトン NMR スペクトル。600 MHz の分光器を用いて 129 残基のニワトリ・リゾチームを軽水中で測定した。横軸は ppm 単位で表示した化学シフト δ 。周波数軸を左向きにとるのが NMR スペクトル表示の習慣。

§14 スピン角運動量ベクトルの運動

スピン状態を密度演算子 $\hat{\sigma}$ で表し、Liouville - von Neumann の式に従って、その状態変化を記述するという立場で NMR 現象を考察しよう。密度演算子 $\hat{\sigma}$ の時間発展というと難しそうに聞こえるが、スピン演算子 \hat{I}_x を \hat{I}_z 軸の周りで角度 θ だけ回転するという操作に対応する演算子 $e^{-i\theta\hat{I}_z}\hat{I}_xe^{i\theta\hat{I}_z}$ の計算方法を理解すればよい。この計算にはスピン演算子: $\hat{I}_x, \hat{I}_y, \hat{I}_z$ の間の交換関係さえ理解していればよく、その結果得られるスピン演算子の運動は、古典的なスピン角運動量ベクトル \vec{I} の歳差運動とよく対応している。2 スピン間にスピン結合が存在して、ハミルトニアンに J -結合項が入ってくると、 $\hat{\sigma}$ の中に演算子 $\hat{I}_x\hat{S}_z$ というような状態 (項) が現れる。この項は古典的なベクトルモデルでは説明できない。anti-phase single quantum (SQ) coherence と呼ばれていて、コヒーレンス移行などを起こす重要な演算子であり、多次元 NMR スペクトル測定法の要である。この演算子の運動を理解するためには量子力学的取り扱いが不可欠になる。別の言い方をすれば、そこだけ理解すればタンパク質 NMR の物理的基礎は十分理解可能である。量子力学的

取り扱いに関して以下では簡単な説明だけを述べるが、詳細は「タンパク質 NMR の物理的基礎—スピン状態の量子論から 2 次元スペクトル測定法まで」という拙書を参考にさせていただきたい (<http://hdl.handle.net/10236/00027165>)。

1) 核スピンの古典力学的歳差運動—ベクトル模型の Bloch 方程式

核スピンの角運動量ベクトルを \vec{I} と表すと、それに伴う磁気モーメントは $\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$ と表される。ここで γ は磁気角運動量比である。静止磁場 \vec{B}_0 が存在する中に磁気モーメントが置かれると、トルク $\vec{\mu} \times \vec{B}_0$ が働くので、角運動量 \vec{I} の運動方程式は古典力学に従って次式で与えられる。これが核スピンの運動の Bloch 的描像である。

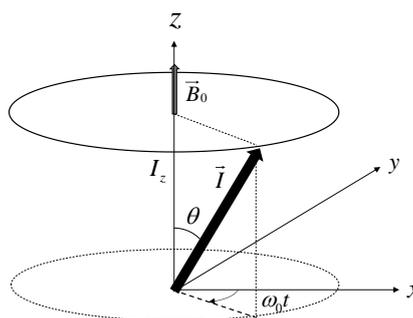
$$d\vec{I}/dt = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 = \gamma \vec{I} \times \vec{B}_0 \quad (5.2)$$

\vec{B}_0 が z 軸の正方向であることに注意して、 x, y, z 成分に分けて微分方程式を書くと、

$$dI_z/dt = 0, \quad dI_x/dt = \gamma B_0 I_y, \quad dI_y/dt = -\gamma B_0 I_x \quad (5.3)$$

この方程式の解は角運動量が \vec{I} という「こま」が、重力によるトルクを受けて行う歳差運動とまったく同じである。実際、 \vec{I} の z 成分は時間的に一定値をとり、 z 軸と \vec{I} の角度 θ は一定で、 $I_z = I_0 \cos \theta$ (I_0 は \vec{I} の大きさ) となる。また、 $-\gamma B_0 \equiv \omega_0$ と表すと、ベクトル \vec{I} の x, y 成分に対する解は、初期位相を 0 とすると、

$$\begin{aligned} I_x(t) &= (I_0 \sin \theta) \cos \omega_0 t \\ I_y(t) &= (I_0 \sin \theta) \sin \omega_0 t \end{aligned} \quad (5.4)$$



となる。すなわち、 $\gamma > 0$ の場合、 $\omega_0 < 0$ より \vec{I} は \vec{B}_0 のまわりを z 軸の負の向きに角速度 $|\omega_0|$ で、「こまの芯」のように歳差運動する。これが核スピンの歳差運動のベクトル模型である (右図参照)。

2) Bloch 方程式の量子論的解釈

核スピンの運動を厳密に取り扱うためには、量子力学的考察を避けることはできない。量子力学の基礎に基づくと、量子状態を波動関数 Ψ で表し、物理量を表す演算子 \hat{A} の期待値 $\langle \hat{A} \rangle$ を求めることによって、その状態における物理量の観測値を知ることができる。量子状態の時間変化は系のエネルギーを表すハミルトニアンという演算子 \hat{H} を用いて、 $i \partial \Psi / \partial t = \hat{H} \Psi$ のように記述できる。左辺は本来 $i\hbar (\partial \Psi / \partial t)$ であるが、簡単

化のため、今後しばしば $\hbar=1$ として記述する。この式は time-dependent Schrödinger equation と呼ばれる。 \hat{H} が時間 t に依存しない場合は、 $\Psi(\mathbf{x}, t) = \psi(\mathbf{x}) \cdot \varphi(t)$ と表して上記の方程式を解くと、 $i\partial\Psi/\partial t = i(\partial\varphi/\partial t)\psi(\mathbf{x}) = \varphi\hat{H}\psi$ となる。両辺に左から ψ^* を掛けて \mathbf{x} で積分すると、 $i\partial\varphi/\partial t = E\varphi$ ただし、 $E \equiv \int \psi^*(\mathbf{x})\hat{H}\psi(\mathbf{x})d\mathbf{x}$ と表される。 E は \hat{H} の期待値 $\langle \hat{H} \rangle$ なのでスピン状態のエネルギーを表している。 $\varphi(t) = e^{-iEt}$ なので、

$$\Psi(\mathbf{x}, t) = e^{-iEt} \cdot \psi(\mathbf{x}) \quad (5.5)$$

と表される ($\hbar=1$ としているので、 e^{-iEt} となっているが、正しくは E/\hbar である)。

$I=1/2$ のスピン ($\hbar=1$ として表記) の磁気モーメントの時間変化を考察しよう。時間に依存する任意の状態の波動関数を、スピン角運動量の z 成分 I_z が $1/2$ と $-1/2$ のエネルギー固有関数 ψ_α と ψ_β (固有値 E_α と E_β) の線形結合で表現すると、 a, b を任意の実数係数として次のように表される (ψ_α, ψ_β は直交・規格化されている)。

$$\Psi(\mathbf{x}, t) = ae^{-iE_\alpha t} \cdot \psi_\alpha(\mathbf{x}) + be^{-iE_\beta t} \cdot \psi_\beta(\mathbf{x}), \quad a^2 + b^2 = 1 \quad (5.6)$$

静止磁場 \vec{B}_0 (z 軸正方向) 内に存在する磁気モーメント $\vec{\mu} = \gamma\vec{I}$ のハミルトニアンは $\hat{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\gamma\vec{I} \cdot \vec{B}_0 = -\gamma B_0 \hat{I}_z$ である。今後は、 I_z を表す演算子を \hat{I}_z と書く。従って、演算子 \hat{H} のエネルギー固有値は、 $\hat{H}|\psi_\alpha\rangle = -\gamma B_0 \hat{I}_z |\psi_\alpha\rangle = -(1/2)\gamma B_0 |\psi_\alpha\rangle = E_\alpha |\psi_\alpha\rangle$ より、 $E_\alpha = -(1/2)\gamma B_0$, $E_\beta = (1/2)\gamma B_0$ である ($\hbar=1$ としていることに注意)。

磁気モーメント $\vec{\mu}$ の期待値を求めよう。積分のかわりにブラケット記号を用いると

$$\begin{aligned} \langle \mu_z \rangle &= \int \Psi^* \mu_z \Psi d\mathbf{x} \equiv \langle \Psi | \mu_z | \Psi \rangle = \gamma \langle ae^{-iE_\alpha t} \psi_\alpha + be^{-iE_\beta t} \psi_\beta | \hat{I}_z | ae^{-iE_\alpha t} \psi_\alpha + be^{-iE_\beta t} \psi_\beta \rangle \\ &= \gamma \left\{ a^2 \langle \psi_\alpha | \hat{I}_z | \psi_\alpha \rangle + ab \cdot e^{-i(E_\beta - E_\alpha)t} \langle \psi_\alpha | \hat{I}_z | \psi_\beta \rangle + ab \cdot e^{i(E_\beta - E_\alpha)t} \langle \psi_\beta | \hat{I}_z | \psi_\alpha \rangle \right. \\ &\quad \left. + b^2 \langle \psi_\beta | \hat{I}_z | \psi_\beta \rangle \right\} = (\gamma/2)(a^2 - b^2) \end{aligned} \quad (5.7)$$

上記の計算において、基底波動関数の規格化・直交性を用いている。確かに、磁気モーメントの z 成分は時間に依存しない定数である。 $\gamma/2 = \gamma I_0$, $a^2 - b^2 = \cos\theta$ と表すと、 $\langle \mu_z \rangle = \gamma I_0 \cos\theta$ となる。一方、 $\vec{\mu}$ の x, y 成分を求めてみよう。今後は簡単化のために、 $\langle \psi_\alpha | \hat{I}_x | \psi_\beta \rangle \equiv \langle \alpha | \hat{I}_x | \beta \rangle$ と表記する。スピン角運動量、 $\hat{I}_x, \hat{I}_y, \hat{I}_z$ の間に成り立つ不確定性関係を用いると $\hat{I}_x|\alpha\rangle = (1/2)|\beta\rangle$, $\hat{I}_x|\beta\rangle = (1/2)|\alpha\rangle$ が成り立つ (補足的解説を参照)。

$\langle \Psi | \mu_x | \Psi \rangle = \gamma \langle ae^{-iE_\alpha t} \psi_\alpha + be^{-iE_\beta t} \psi_\beta | \hat{I}_x | ae^{-iE_\alpha t} \psi_\alpha + be^{-iE_\beta t} \psi_\beta \rangle$ を計算すると、

$$\langle \mu_x \rangle = \gamma \left\{ abe^{-i(E_\beta - E_\alpha)t} \langle \alpha | \hat{I}_x | \beta \rangle + abe^{i(E_\beta - E_\alpha)t} \langle \beta | \hat{I}_x | \alpha \rangle \right\} = \gamma ab \cos\omega_0 t \quad (5.8)$$

となる。ただし、 $E_\alpha - E_\beta = -\gamma B_0 \equiv \omega_0$ を用いている。一方、 y 成分は、 $\hat{I}_y|\alpha\rangle = (i/2)|\beta\rangle$, $\hat{I}_y|\beta\rangle = -(i/2)|\alpha\rangle$ を用いて、 $\langle \mu_y \rangle = \langle \Psi | \mu_y | \Psi \rangle = \gamma ab \sin\omega_0 t$ が成り立つ。 $a^2 + b^2 = 1$ と

$a^2 - b^2 = \cos \theta$ より $\sin \theta = 2ab$ となるので、 $\gamma ab = (\gamma/2) \sin \theta = \gamma I_0 \sin \theta$ となる。結局、

$$\langle \mu_x \rangle = \gamma I_0 \sin \theta \cdot \cos \omega_0 t, \quad \langle \mu_y \rangle = \gamma I_0 \sin \theta \cdot \sin \omega_0 t, \quad \langle \mu_z \rangle = \gamma I_0 \cos \theta \quad (5.9)$$

となり、スピンの運動はベクトル模型と全く同じ式に従うことが分かる。

【補足的解説】 パウリ行列

量子力学が古典力学と基本的に異なる点は、不確定性原理と呼ばれるものの存在である。この原理が適用される相補的な一組の物理量の典型が位置座標 \mathbf{x} と運動量 \mathbf{p} の関係である。この不確定性関係を数学的に定式化するものが物理量を表す演算子の交換関係である。例えば、 \hat{x} と \hat{p}_x の交換関係、 $[\hat{x}, \hat{p}_x] = \hat{x}\hat{p}_x - \hat{p}_x\hat{x} = i\hbar$ は、 x 座標と運動量の x 成分 p_x が同時に確定的な値を取ることができないことを表している。NMR 現象の場合には、角運動量の x, y, z 成分の間に不確定性関係が存在している。それは次の交換関係によって定式化される。

$$[\hat{I}_x, \hat{I}_y] = i\hat{I}_z, \quad [\hat{I}_y, \hat{I}_z] = i\hat{I}_x, \quad [\hat{I}_z, \hat{I}_x] = i\hat{I}_y \quad (5.10)$$

最初の式を巡回置換したものが次の 2 式である。 \hat{I}_z の固有値が $1/2, -1/2$ となる固有状態を $|\alpha\rangle, |\beta\rangle$ とし、それを基底ベクトルとして、 $\hat{I}_x, \hat{I}_y, \hat{I}_z$ を行列表現すると、下記のパウリ行列が得られる。

$$\hat{I}_x = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}, \quad \hat{I}_y = \frac{i}{2} \begin{pmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}, \quad \hat{I}_z = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}, \quad \text{単位演算子 } \hat{E} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5.11)$$

また、以下の式も覚えておくと便利な関係式である。

$$\begin{aligned} \hat{I}_x^2 = \hat{I}_y^2 = \hat{I}_z^2 = \hat{E}/4 \\ \hat{I}_x \hat{I}_y = -\hat{I}_y \hat{I}_x, \quad \hat{I}_x \hat{I}_y = i\hat{I}_z/2, \quad \text{その巡回置換をして } \hat{I}_y \hat{I}_z = i\hat{I}_x/2, \quad \hat{I}_z \hat{I}_x = i\hat{I}_y/2 \end{aligned} \quad (5.12)$$

3) NMR 現象を演算子形式の量子力学で考察する

上記の議論は波動関数形式の量子力学でスピンの運動を記述したが、以下では演算子形式の量子力学でスピンの運動を考察しよう。すなわち、密度演算子 $\hat{\sigma}$ でスピンの状態を表し、その時間変化を考察する。そうすると都合がよい理由は後で説明する。

(i) 密度行列 $\hat{\sigma}$ はスピンの量子状態を表す演算子

系の量子状態を表すのに、波動関数形式では波動関数 $|\Psi\rangle$ を使い、物理量 \hat{A} の期待値は $\langle \hat{A} \rangle = \langle \Psi | \hat{A} | \Psi \rangle$ と表される。系の量子状態 $|\Psi\rangle$ を基底関数 $|n\rangle$ の線形結合で表すと、 c_n を複素係数として $|\Psi\rangle = \sum_n c_n |n\rangle$ のように表される。基底関数 $|n\rangle$ には時間依存性がなく、係数 c_n が時間に依存すると考える。物理量を表す演算子を \hat{A} とすると、

$$\langle \hat{A} \rangle = \langle \Psi | \hat{A} | \Psi \rangle = \sum_{m,n} c_m^* c_n \langle m | \hat{A} | n \rangle = \sum_{m,n} c_n c_m^* \cdot A_{m,n} \quad (5.11)$$

と表される。 $c_n c_m^* = \sigma_{n,m}$ と表して、それを演算子 $\hat{\sigma}$ の (n,m) 成分と定義すると、

$$\langle \hat{A} \rangle = \sum_{m,n} c_n c_m^* \cdot A_{m,n} = \sum_n \sum_m \sigma_{n,m} \cdot A_{m,n} = \sum_n (\hat{\sigma} \hat{A})_{n,n} = \text{Tr} \{ \hat{\sigma} \hat{A} \} \quad (5.12)$$

すなわち、 $\langle \Psi | \hat{A} | \Psi \rangle = \text{Tr} \{ \hat{\sigma} \hat{A} \}$ が成り立つ。 $\hat{\sigma}$ のことを密度行列 (密度演算子) と呼び、 $\hat{\sigma}$ が分かれば、 $\text{Tr} \{ \hat{\sigma} \hat{A} \}$ によって任意の物理量の期待値が得られるので、 $\hat{\sigma}$ は波動関数形式の量子力学における状態関数 Ψ と同じ役割を果たしている。

(ii) Liouville - von Neumann の式

状態関数 Ψ の時間変化は、時間依存性のある Schrödinger 方程式にしたがって、ハミルトニアン \hat{H} によって決定される。Schrödinger 形式の場合、スピンの状態は波動関数 Ψ で表され、スピンの運動方程式は $i(\partial\Psi/\partial t) = \hat{H}\Psi$ と表される。 Ψ を $\sum_n c_n |n\rangle$ と基底関数で展開し、時間の関数である係数 c_n の時間微分を計算して Schrödinger 方程式を書き換えると、密度行列 $\hat{\sigma}$ の成分 $\sigma_{n,m} = c_n c_m^*$ を用いて、

$$i d\hat{\sigma}/dt = [\hat{H}, \hat{\sigma}] \quad (5.13)$$

と表される。ただし、 $[\hat{H}, \hat{\sigma}] = \hat{H}\hat{\sigma} - \hat{\sigma}\hat{H}$ である。これは Liouville - von Neumann の式と呼ばれ、演算子形式の量子力学における Schrödinger 方程式に対応する。(この式の導出の詳細は前述の「タンパク質 NMR の物理的基礎」というテキストの P. 5-6 を参照、今後はこの参考資料を単にテキストと呼ぶ)。

前節では波動関数 Ψ を用いてスピン角運動量の期待値 $\langle \mu_x \rangle, \langle \mu_y \rangle, \langle \mu_z \rangle$ を計算し、磁化ベクトル $\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$ の運動が古典的なベクトル模型に従う \vec{I} の運動と同じであることを見た。しかし、NMR 現象を考察する場合、今後は波動関数 Ψ ではなく状態を表す演算子として直接 $\hat{\sigma}$ を考察する。それは、 $\hat{\sigma}$ の時間変化がスピン \vec{I} の古典力学的運動とよく対応しているからである。以下ではそのことを考察してみる。はじめに、Liouville - von Neumann の式の解を求めてみよう。 \hat{H} が time-independent の場合、その方程式は容易に解けて、 $\hat{\sigma}(0)$ を時刻 $t=0$ におけるスピンの状態とすると、 $\hat{\sigma}(t)$ は

$$\hat{\sigma}(t) = e^{-i\hat{H}t} \hat{\sigma}(0) e^{i\hat{H}t} \quad (5.14)$$

と表される。 $\hat{\sigma}(t)$ はハミルトニアン \hat{H} のもとで t だけ時間展開した後のスピンの状態である。これが Liouville - von Neumann の式の解になっていることを確かめてみよう。

【証明】 $\hat{\sigma}(t) = e^{-i\hat{H}t} \hat{\sigma}(0) e^{i\hat{H}t}$ と仮定すると、 $d/dt(e^{i\hat{H}t}) = i\hat{H} \cdot e^{i\hat{H}t}$ とすることを考慮して、
 $d\hat{\sigma}/dt = d/dt(e^{-i\hat{H}t} \hat{\sigma}(0) e^{i\hat{H}t}) = -i\hat{H} \cdot e^{-i\hat{H}t} \hat{\sigma}(0) e^{i\hat{H}t} + e^{-i\hat{H}t} \hat{\sigma}(0) e^{i\hat{H}t} \cdot i\hat{H} = -i(\hat{H}\hat{\sigma} - \hat{\sigma}\hat{H}) = -i[\hat{H}, \hat{\sigma}]$
 以上、 $\hat{\sigma}(t) = e^{-i\hat{H}t} \hat{\sigma}(0) e^{i\hat{H}t}$ は確かに Liouville - von Neumann の式の解である。

(iii) スピンの運動を記述するハミルトニアン \hat{H}

すでに述べたように、静止磁場 \vec{B}_0 (z 軸正方向) 内に存在するスピンの働くハミルトニアンは $\hat{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\gamma \vec{I} \cdot \vec{B}_0 = -\gamma B_0 \hat{I}_z$ である。 $\omega_0 = -\gamma B_0 < 0$ と表せば、 $\hat{H} = \omega_0 \hat{I}_z$ と表される。さらに、ラジオ波を照射しているときのハミルトニアンを考えよう。実験室系で X 軸方向に直線振動しているラジオ波 (rf-波と略す) の磁場 $\vec{B}_1(t)$ を 2 つの円偏光磁場の重ね合わせと考えるとき、時計回りに回転する円偏光磁場だけがスピンの共鳴現象に関与する (テキスト p.9-10 を参照)。なぜなら、スピンの歳差運動と同期した回転座標系から見て静止している磁場だけがスピンの共鳴現象を引き起こすからである。それを $\vec{B}_{1,r}(t)$ と表す、rf-パルスの振動数を $\omega_{rf} (< 0)$ として、ハミルトニアンに円偏光磁場 $\vec{B}_{1,r}(t) = B_1 \cos(\omega_{rf}t) \cdot \vec{e}_x + B_1 \sin(\omega_{rf}t) \cdot \vec{e}_y$ が加わる。その結果、

$$\begin{aligned} \hat{H} &= -\vec{\mu} \cdot (\vec{B}_0 + \vec{B}_{1,r}) = -\gamma B_0 \hat{I}_z - \gamma B_1 [\cos(\omega_{rf}t) \hat{I}_x + \sin(\omega_{rf}t) \hat{I}_y] \\ &= \omega_0 \hat{I}_z + \omega_1 [\cos(\omega_{rf}t) \hat{I}_x + (\sin \omega_{rf}t) \hat{I}_y] \end{aligned} \quad (5.15)$$

ただし、 $\vec{\mu} \cdot \vec{e}_x = \gamma \hat{I}_x$ 、 $\vec{\mu} \cdot \vec{e}_y = \gamma \hat{I}_y$ 、 $\omega_0 = -\gamma B_0$ 、 $\omega_1 = -\gamma B_1$ と表した。

(iv) 回転座標系への変換、rf-パルス照射時のハミルトニアン

rf-パルスが存在している場合はハミルトニアンが time-dependent になるので、Liouville - von Neumann の式を解くためには、回転座標系に変換してハミルトニアンを time-independent にする必要がある。その結果だけを手短かに述べる。ユニタリ行列 (複素直交変換) \hat{U} を用いて実験室系の物理量を回転座標系における観測量に変換する。 \hat{U} を用いて $\hat{\sigma}$ や \hat{H} をユニタリ変換し添え字 r を付けて表示すると、 $\hat{\sigma}^r = \hat{U} \hat{\sigma} \hat{U}^{-1}$ 、 $\hat{H}^r = \hat{U} \hat{H} \hat{U}^{-1}$ と表される ($\hat{U}^{-1} = \hat{U}^\dagger$)。ユニタリ行列を $\hat{U} = e^{i\omega_{rf}t \hat{I}_z}$ と選んで計算する。 $\hat{\sigma}^r$ の運動方程式は: $i(d\hat{\sigma}^r/dt) = [\hat{H}_e, \hat{\sigma}^r]$ と表され、 $\hat{H}_e = \hat{H}^r - i\hat{U}(d\hat{U}^{-1}/dt)$ である (計算の詳細はテキスト p.7-8 参照)。 \hat{H}_e は有効ハミルトニアンと呼ばれ、第 2 項は回転座標系に変換したときの慣性力 (コレオリカ) に対応している。 \hat{H}_e を求めるため、はじめに、 $\hat{H}^r = \hat{U} \hat{H} \hat{U}^{-1}$ を計算してみよう。

$$\begin{aligned} \hat{H}^r &= \hat{U} \hat{H} \hat{U}^{-1} = \omega_0 e^{i\omega_{rf}t \hat{I}_z} \hat{I}_z e^{-i\omega_{rf}t \hat{I}_z} \\ &\quad + \omega_1 \left[\cos(\omega_{rf}t) e^{i\omega_{rf}t \hat{I}_z} \hat{I}_x e^{-i\omega_{rf}t \hat{I}_z} + \sin(\omega_{rf}t) e^{i\omega_{rf}t \hat{I}_z} \hat{I}_y e^{-i\omega_{rf}t \hat{I}_z} \right] \end{aligned} \quad (5.16)$$

ここで、 $e^{-i\theta \hat{I}_z} \hat{I}_x e^{i\theta \hat{I}_z}$ という演算は、 \hat{I}_x を \hat{I}_z 軸の周りで角度 θ だけ回転させるという意味を持っている。この計算のルールは今後頻繁に使用するので、以下で詳しく説明する。

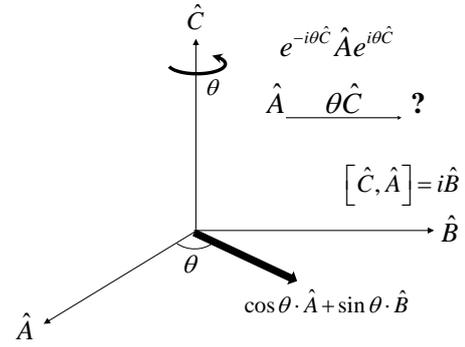
重要な関係式： $e^{-i\theta\hat{C}}\hat{A}e^{i\theta\hat{C}}$ の計算ルール

回転演算子に関連して、便利な次の関係式が成り立つ。演算子 $\hat{A}, \hat{B}, \hat{C}$ があって、次の交換関係： $[\hat{C}, \hat{A}] = i\hat{B}$ および $[\hat{B}, \hat{C}] = i\hat{A}$ が成り立っているとする。このとき、 \hat{A} を \hat{C} 軸のまわりで角度 θ だけ回転させるという操作を演算子で表すと、 $e^{-i\theta\hat{C}}\hat{A}e^{i\theta\hat{C}}$ となる。これを計算すると、

$$e^{-i\theta\hat{C}}\hat{A}e^{i\theta\hat{C}} = \hat{A}\cos\theta + \hat{B}\sin\theta \quad (5.17)$$

となる。この証明はテキストの P. 12 に述べられているので、ここでは省略し、むしろその公式の使い方の習熟に重点を置いて説明する。今後、 \hat{A} を \hat{C}

軸のまわりで θ だけ回転させるという操作を図式的に、 $\hat{A} \xrightarrow{\theta\hat{C}} e^{-i\theta\hat{C}}\hat{A}e^{i\theta\hat{C}}$ と表記し、その操作を右図のように表示する。第 3 番目の軸は $[\hat{C}, \hat{A}] = i\hat{B}$ という交換関係から得られる演算子 \hat{B} を採用する。その結果、 \hat{A} 軸上にあつた単位ベクトルを θ だけ回転させた図中のベクトルが $\cos\theta \cdot \hat{A} + \sin\theta \cdot \hat{B}$ と表される。つまり、回転後の



単位ベクトルの \hat{A} 軸成分、 \hat{B} 軸成分が、それぞれ $\cos\theta$, $\sin\theta$ と考えることに対応する。式(5.17) は、種々の演算子 $\hat{A}, \hat{B}, \hat{C}$ に対して成り立つ重要な関係式である。例えば、演算子 $\hat{I}_x, \hat{I}_y, \hat{I}_z$ に適用すると、交換関係 $[\hat{I}_z, \hat{I}_x] = i\hat{I}_y$ より、 $e^{-i\theta\hat{I}_z}\hat{I}_x e^{i\theta\hat{I}_z} = \cos\theta \cdot \hat{I}_x + \sin\theta \cdot \hat{I}_y$ となる。同様に、 \hat{I}_y を \hat{I}_z 軸の周りで回転させると、 $[\hat{I}_z, \hat{I}_y] = -i\hat{I}_x$ より、第 3 番目の軸が $-\hat{I}_x$ となる。その結果、 $e^{-i\theta\hat{I}_z}\hat{I}_y e^{i\theta\hat{I}_z} = \cos\theta \cdot \hat{I}_y - \sin\theta \cdot \hat{I}_x$ となる。後に出てくる、 \hat{I}_x を $2\hat{I}_z\hat{S}_z$ 軸の周りで θ だけ回転させるという結果は、交換関係 $[2\hat{I}_z\hat{S}_z, \hat{I}_x] = 2i\hat{I}_y\hat{S}_z$ を用いて、 $e^{-i\theta 2\hat{I}_z\hat{S}_z}\hat{I}_x e^{i\theta 2\hat{I}_z\hat{S}_z} = \cos\theta \cdot \hat{I}_x + \sin\theta \cdot 2\hat{I}_y\hat{S}_z$ という関係式が得られる。 $2\hat{I}_y\hat{S}_z$ という演算子の意味は後で考察する。

式(5.16)を計算してみよう。 $e^{i\theta\hat{I}_z}$ と \hat{I}_z は交換可能なので、 $\omega_0 e^{i\omega_f\hat{I}_z}\hat{I}_z e^{-i\omega_f\hat{I}_z} = \omega_0\hat{I}_z$ となる。

第 2、第 3 項は、 \hat{I}_x や \hat{I}_y を \hat{I}_z 軸の周りで $(-\omega_f t)$ 回転させているので、 $e^{i\omega_f\hat{I}_z}\hat{I}_x e^{-i\omega_f\hat{I}_z} = \cos(-\omega_f t)\hat{I}_x + \sin(-\omega_f t)\hat{I}_y$, $e^{i\omega_f\hat{I}_z}\hat{I}_y e^{-i\omega_f\hat{I}_z} = \cos(-\omega_f t)\hat{I}_y - \sin(-\omega_f t)\hat{I}_x$ となる。その結果、

$$\hat{H}^r = \omega_0\hat{I}_z + \omega_1\hat{I}_x \{ \cos(\omega_f t)\cos(\omega_f t) + \sin(\omega_f t)\sin(\omega_f t) \} = \omega_0\hat{I}_z + \omega_1\hat{I}_x \quad (5.18)$$

となる。一方、コレオリカの項は、

$$-i\hat{U}(d/dt)\hat{U}^{-1} = -ie^{i\omega_f\hat{I}_z}(d/dt)(e^{-i\omega_f\hat{I}_z}) = -\omega_f\hat{I}_z \quad (5.19)$$

となり、回転座標系における有効ハミルトニアンは time-independent になって、

$$\hat{H}_e = (\omega_0 - \omega_f)\hat{I}_z + \omega_1\hat{I}_x = \Omega\hat{I}_z + \omega_1\hat{I}_x \quad (5.20)$$

と表される。 \hat{H}_e は Z 軸のまわりを角速度 $\omega_f (< 0)$ で回転している回転座標系 (x, y, z)

で \vec{I} の歳差運動を考察したことに対応しているので、Z 軸まわりの歳差運動は相対角速度 $\Omega = \omega_0 - \omega_{rf}$ [rad/s] で回転している。第 1 項は Zeeman 項と呼ばれる（化学シフト項あるいは off-resonance 項ともいう）。すでに述べたように、プロトンの局所磁場は水素原子が属す原子団に依存しており、共鳴周波数 ω_0 はプロトン毎に僅かに異なる。そのため Ω は化学シフトと呼ばれ ppm 単位で表現される。 $\Omega = 0$ となるスピンを on-resonance スピンと呼び、そのスピンに対するハミルトニアンは、 $\hat{H} = \omega_1 \hat{I}_x$ と表される（今後、スピンの運動は、通常、回転座標系から見て議論するので、有効ハミルトニアンを単にハミルトニアンと呼び、 \hat{H}_e を単に \hat{H} と表す）。実験室系 (X, Y, Z) の X 軸に沿って直線振動しているラジオ波を時計回り反時計回りの円偏光磁場の重ね合わせと考え、その内 ω_{rf} で時計回りに回転している円偏光磁場だけが共鳴現象に関与すると考えたので、回転座標系では x 軸上に静止した磁場として観測される。そのため、式(5.20)の第 2 項の $\omega_1 \hat{I}_x$ は回転座標系で観測される大きさ B_1 の静止磁場による x 軸まわりの歳差運動を引き起こす。 $\hat{H} = \omega_1 \hat{I}_x$ のときのスピンの運動を Liouville - von Neumann の式に従って考察してみよう。 $t = 0$ の熱平衡状態において z 軸方向を向いていたスピんに rf-パルスを Δt_p 時間照射すると、 $\hat{\sigma}^{eq}(0) = \hat{I}_z$ の状態から時間発展し、式(5.14)を考慮すると、

$$\hat{\sigma}(\Delta t_p) = e^{-i\omega_1 \Delta t_p \hat{I}_x} \hat{I}_z e^{i\omega_1 \Delta t_p \hat{I}_x} = \cos(\omega_1 \Delta t_p) \hat{I}_z - \sin(\omega_1 \Delta t_p) \hat{I}_y \quad (5.21)$$

となる。式(5.21)は、 \hat{I}_z を \hat{I}_x 軸の周りで角度 $\omega_1 \Delta t_p$ 回転させるという操作を表しているので、上記のような結果が得られた。 $t = 0$ で熱平衡状態にある密度演算子 $\hat{\sigma}^{eq}(0)$ が \hat{I}_z に比例することはテキストの p.13-14 で解説されている（正確には $\hat{\sigma}_{eq} = K_I \hat{I}_z$ で $K_I = \hbar \gamma_I B_0 / 2k_B T$ であるが、必要のない限り $K_I = 1$ としておく）。 $\omega_1 \Delta t_p = \pi/2$ となったときラジオ波の照射を止めると、 $\hat{\sigma}(\Delta t_p) = -\hat{I}_y$ となる。つまり、スピンは z 軸から x 軸の周りに 90° 回転して -y 軸方向に倒れたことを意味している。このようなラジオ波を 90° パルスという。回転座標系の x 軸方向に静止する磁場によって 90° 倒したので 90°_x パルスという。実験室系の X 軸上で直線振動する磁場の初期位相を 90° 早めると、時計回りの円偏光磁場は $t = 0$ のとき回転座標系の y 軸方向を向き、反時計回りの方は -y 軸を向いているので、y 軸上に静止する磁場を作成できる。つまり、実験室系で直線振動する磁場の初期位相を制御することによって、回転座標系上の様々な方向から 90° パルスを照射することが可能になる。また、 90° パルスで xy 平面上に倒れたスピンは位相が揃っているため、このような横磁化のことを「コヒーレンス」とよぶ。例えば \hat{I}_z に 90°_y というパルス

を照射すると、横磁化は x 軸上に揃いパルス照射直後の状態は \hat{I}_x と表される。

スピンの運動を密度演算子 $\hat{\sigma}$ で表すことの利点を考えてみよう。熱平衡状態におけるスピンの状態は $\hat{\sigma}^{eq} = \hat{I}_z$ であった。これはベクトル模型で考えるスピンの初期状態の描像と同じである。これを y 軸の周りで 90° 回転させるとスピンの状態は \hat{I}_x となる。さらに、そのベクトルを z 軸の周りで角度 Ωt だけ回転させると、スピンの状態は $\hat{\sigma}(t) = e^{-i\Omega \hat{I}_z} \hat{I}_x e^{i\Omega \hat{I}_z} = \cos(\Omega t) \hat{I}_x + \sin(\Omega t) \hat{I}_y$ と表される。すなわち、量子力学的に考察した密度演算子 $\hat{\sigma}$ の運動は古典的なベクトル模型の \vec{I} の運動と全く同じである。この事がスピンの量子力学的な運動を密度演算子 $\hat{\sigma}$ で考察することの利点である。

(v) 横磁化 (コヒーレンス) の自由歳差運動と FID 信号の観測

90°_y パルス照射直後の状態 $\hat{\sigma}(0) = \hat{I}_x$ を rf -磁場の存在しない \hat{H} の下で t だけ時間展開する、これをスピンの自由歳差運動と呼び、 $\hat{\sigma}(0) \xrightarrow{\hat{H}t} \hat{\sigma}(t)$ と表す。ただし、回転座標系で考察しているので、 $\hat{H} = \Omega \hat{I}_z$ である。その結果、 $\hat{\sigma}(t) = e^{-i\Omega \hat{I}_z} \hat{I}_x e^{i\Omega \hat{I}_z} = \cos(\Omega t) \hat{I}_x + \sin(\Omega t) \hat{I}_y$ という式が得られる。通常、NMR 実験においては、直交位相検波 (quadrature detection) という方法によって (下記注参照)、複素数化された磁化ベクトル $M^+ = M_x + iM_y = \gamma \hbar (\hat{I}_x + i\hat{I}_y)$ が観測される。従って、回転座標系で観測される NMR 信号は歳差運動を表す $\hat{\sigma}(t)$ とスピン演算子 \hat{I}_x と \hat{I}_y を用いて、

$$\begin{aligned} \langle M^+(t) \rangle &= \text{Tr} \{ \hat{\sigma}(t) \hat{M}^+ \} = \gamma \hbar \text{Tr} \left\{ \left(\hat{I}_x \cos \Omega t + \hat{I}_y \sin \Omega t \right) \cdot \left(\hat{I}_x + i\hat{I}_y \right) \right\} \\ &= \gamma \hbar \text{Tr} \left\{ \hat{I}_x^2 \cos \Omega t + i\hat{I}_y^2 \sin \Omega t + i\hat{I}_x \hat{I}_y \cos \Omega t + \hat{I}_y \hat{I}_x \sin \Omega t \right\} \\ &= (\gamma \hbar / 2) (\cos \Omega t + i \sin \Omega t) = (\gamma \hbar / 2) e^{i\Omega t} \end{aligned} \quad (5.22)$$

ただし、 $\hat{I}_x^2 = \hat{I}_y^2 = \hat{E}/4$ 、 $\hat{I}_x \hat{I}_y = i\hat{I}_z/2$ を用いて計算している。この式は、 $\hat{\sigma}(t)$ を用いて量子力学的に厳密に解いても、オブザーバブル (観測量) である複素磁化ベクトル $\langle M^+(t) \rangle$ が回転座標系の x 軸上の位置から z 軸のまわりを角速度 Ω で回転していることを示している。 $\langle M^+(t) \rangle$ を FID (Free Induction Decay) 信号と呼び、検出コイルで電気信号として観測し、それをフーリエ変換した $S(\omega)$ が NMR スペクトルである。

e^{-t/T_2} という緩和項を考慮して、 $S(\omega) = \int_0^\infty e^{i\Omega t} e^{-t/T_2} e^{-i\omega t} dt = A_\Omega(\omega) + iD_\Omega(\omega)$ と表され、 $A_\Omega(\omega)$ は吸収スペクトル、 $D_\Omega(\omega)$ は分散スペクトルと呼ばれる。

$$A_\Omega(\omega) = T_2 / \left(1 + T_2^2 (\Omega - \omega)^2 \right), \quad D_\Omega(\omega) = T_2^2 (\Omega - \omega) / \left(1 + T_2^2 (\Omega - \omega)^2 \right)$$

NMR スペクトルは通常吸収項 $A_\Omega(\omega)$ を表示するように設定されている。

<注> FID 信号は実験室系で静止した検出器で観測される。従って、FID 信号は周波数 ω_0 の信号であるが、周波数 ω_{rf} の検波器を通して受信した信号は周波数 $\omega_0 - \omega_{rf}$ の信号となる。つまり、検波器を通して得られる FID 信号は回転座標系で観測したスピンの歳差運動を観測したことに対応する。

4) スピン結合した 2 スピン系の運動：スピン状態 \hat{I}_x と $\hat{I}_x \hat{S}_z$ の FID 信号

(i) スピン結合項を含むハミルトニアン

上記のハミルトニアン $\hat{H} = \Omega \hat{I}_z$ は 1 個のスピンのみが単独で運動している場合に成り立つ。しかし、タンパク質中のプロトンはスピン結合を通して他の原子核スピンと相互作用している。これは原子間の共有結合に関与する電子雲を介して働く核スピン間の相互作用で J -結合 (スカラーカップリング) 項としてハミルトニアンに含まれる。例えば、アミノ酸残基内の $\text{NH-C}_\alpha\text{H}$ という 2 つの水素原子内のプロトンは J -結合している (一般に、共有結合 3 本以内の水素原子間)。あるいは、主鎖の N 原子を同位体 ^{15}N で置換した場合は、 $^{15}\text{N-H}$ 基の核スピン間に J -結合が存在する。NMR の共鳴線に微細構造が現れて 2 重線になるなど状況が複雑になるだけのように思われるが、タンパク質 NMR 分光学においては必要不可欠な重要な意味を持っている。それは「コヒーレンス移行」という現象である。これを積極的に利用することによって多次元 NMR スペクトルを観測可能にした。以下でそれを少し詳しく考察してみよう。

スピン結合した 2 つのスピンの \mathbf{I} と \mathbf{S} が存在する場合、 \mathbf{I} スピンの運動を考察する。ハミルトニアンは $\hat{H} = \Omega_I \hat{I}_z + \Omega_S \hat{S}_z + 2\pi J \cdot \hat{I}_z \hat{S}_z$ と表され、第 3 項が J -結合と呼ばれる。最初、 \mathbf{I} スピンに 90°_y パルス照射して $\hat{\sigma}(0) = \hat{I}_x$ という状態にする。その後 t 時間たつと \mathbf{I} スピンの状態は、 $\hat{\sigma}(t) = e^{-i\hat{H}t} \hat{I}_x e^{i\hat{H}t}$ と表される。この計算には、 $\Omega_I \hat{I}_z$ の項による時間展開と、 $2\pi J t \cdot \hat{I}_z \hat{S}_z$ の項による時間展開が必要であるが ($\Omega_S \hat{S}_z$ の項は \mathbf{I} スピンの状態に何も影響しない)、演算子 \hat{I}_z と $\hat{I}_z \hat{S}_z$ は交換可能なので、 $\hat{\sigma}_1 = \Omega_I t \hat{I}_z \hat{\sigma}_2$ 、 $\hat{\sigma}_2 = 2\pi J t \hat{I}_z \hat{S}_z \hat{\sigma}_3$ というように、それぞれの項による状態変化をカスケードに演算することができる。 $\Omega_I \hat{I}_z$ で t 時間展開し、ついで、 $2\pi J t \hat{I}_z \hat{S}_z$ で t 時間展開する。これをカスケード展開という。 $\hat{\sigma}_1 = \hat{\sigma}(0) = \hat{I}_x$ より、 $\hat{\sigma}_2 = e^{-i\Omega_I t} \hat{I}_x e^{i\Omega_I t} = \cos(\Omega_I t) \hat{I}_x + \sin(\Omega_I t) \hat{I}_y$ となる。さらに、それぞれの項を $2\hat{I}_z \hat{S}_z$ 軸のまわりで角度 $\pi J t$ だけ回転させる必要がある。以下で、それを詳しく考察してみよう。

(ii) スピン結合項 $2\pi\hat{J}_z\hat{S}_z$ の下で \hat{I}_x 、 \hat{I}_y を t 時間展開する

$\hat{\sigma}_2 \xrightarrow{\pi Jt \cdot 2\hat{I}_z\hat{S}_z} \hat{\sigma}_3$ を計算しよう。はじめに、交換関係 $[2\hat{I}_z\hat{S}_z, \hat{I}_x]$ を考察する。2 スピン系の演算子は直積空間という考え方が必要である (テキストの p16 参照)。I スピンと S スピンの直積空間を考察すると、 $\hat{I}_z\hat{S}_z$ は $\hat{I}_z \otimes \hat{S}_z$ 、 \hat{I}_x は $\hat{I}_x \otimes \hat{E}$ と表される。 $\hat{I}_z \otimes \hat{S}_z$ は演算子 \hat{I}_z と \hat{S}_z が I と S スピン空間の状態に独立して作用するので、 $\hat{I}_z\hat{S}_z\hat{I}_x$ は $\hat{I}_z\hat{I}_x\hat{S}_z$ と書いても同じ結果を与える。直積空間での直交規格化された基底演算子は $2\hat{I}_z\hat{S}_z$ なので (その理由は以下で説明)、 $\hat{\sigma}_2 \rightarrow \hat{\sigma}_3$ の操作は $2\hat{I}_z\hat{S}_z$ 軸のまわりで \hat{I}_x あるいは \hat{I}_y を πJt 回転させると考える。 $[2\hat{I}_z\hat{S}_z, \hat{I}_x] = 2[\hat{I}_z, \hat{I}_x]\hat{S}_z = 2i\hat{I}_y\hat{S}_z$ となるので、式(5.17)を適用すると、 $e^{-i2\pi\hat{J}_z\hat{S}_z t}\hat{I}_x e^{i2\pi\hat{J}_z\hat{S}_z t} = \cos(\pi Jt)\hat{I}_x + \sin(\pi Jt)2\hat{I}_y\hat{S}_z$ である。同様に、 $[2\hat{I}_z\hat{S}_z, \hat{I}_y] = -2i\hat{I}_x\hat{S}_z$ を用いて \hat{I}_y の時間展開を計算すると、

$$\hat{\sigma}_3 = \hat{\sigma}(t) = \cos(\Omega_I t) \left[\cos(\pi Jt)\hat{I}_x + \sin(\pi Jt)2\hat{I}_y\hat{S}_z \right] + \sin(\Omega_I t) \left[\cos(\pi Jt)\hat{I}_y - \sin(\pi Jt)2\hat{I}_x\hat{S}_z \right] \quad (5.23)$$

$\hat{\sigma}_3$ には $2\hat{I}_y\hat{S}_z$ とか $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ という項が現れている。この項は古典的なベクトルモデルでは説明のできないスピン状態である。このような状態の意味はこれから考察していく。上記は 90° パルス後の初期状態が $\hat{\sigma}(0) = \hat{I}_x$ であったときのスピンの時間変化であるが、初期状態が $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ であるときのスピンの運動は以下で考察する。 \hat{I}_x は in-phase SQ(single quantum)-coherence、 $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ は anti-phase SQ-coherence と呼ばれる。その理由は、それぞれのスピン演算子の運動から得られる FID 信号を考慮して意味が明らかになるだろう。

(iii) 2 スピン系における in-phase SQ-coherence : \hat{I}_x の FID 信号

I スピンによる FID 信号は、複素磁化ベクトル $M^+ = \gamma_I \hbar (\hat{I}_x + i\hat{I}_y)$ の期待値 $\langle M^+ \rangle = \gamma_I \hbar \cdot \text{Tr} \left\{ \hat{\sigma}(t) (\hat{I}_x + i\hat{I}_y) \right\}$ である。 $\gamma_I \hbar$ を 1 として考える。式(5.23)の $\hat{\sigma}(t)$ を用いて計算すると、 $\text{Tr} \left\{ \hat{I}_x \cdot \hat{I}_x \right\}$ とか $\text{Tr} \left\{ \hat{I}_x\hat{S}_z \cdot \hat{I}_y \right\}$ という項の計算が必要になるが、2 スピン系の場合は I スピンと S スピンの直積空間という考え方が必要になる (テキスト p16 参照)。すなわち、 $\hat{I}_x\hat{S}_z$ は I スピン空間の演算子が \hat{I}_x 、S スピン空間が \hat{S}_z という演算子で、直積を表す \otimes という記号を用いて $\hat{I}_x \otimes \hat{S}_z$ と記すべきものである。従って、2 スピン系の場合、 \hat{I}_x は $\hat{I}_x \otimes \hat{E}$ という演算子である。そのことに注意すると、上述の $\text{Tr} \left\{ \hat{I}_x \cdot \hat{I}_x \right\}$ は $\hat{I}_x \otimes \hat{E}$ と $\hat{I}_x \otimes \hat{E}$ の積が $\hat{I}_x^2 \otimes \hat{E} = \hat{E}/4 \otimes \hat{E}$ より、4行4列の行列のトレースをとって、 $\text{Tr} \left\{ \hat{I}_x \cdot \hat{I}_x \right\} = 1$ となる。また、 $\text{Tr} \left\{ 2\hat{I}_x\hat{S}_z \cdot 2\hat{I}_x\hat{S}_z \right\} = \text{Tr} \left\{ 4\hat{I}_x^2 \otimes \hat{S}_z^2 \right\} = \text{Tr} \left\{ \hat{E} \otimes \hat{E}/4 \right\} = 1$ も成り立つ。スピン系

の基底演算子 \hat{B}_j, \hat{B}_k の内積は $\langle \hat{B}_j | \hat{B}_k \rangle = \text{Tr} \{ \hat{B}_j \cdot \hat{B}_k \}$ と定義される。テキスト p19 の式 (11.4) に網羅された 16 個の 2 スピン系の演算子は、その内積 (トレース) を計算すると互いに直交しているか 1 である。従って、これらの演算子は I と S スピンの直積空間における直交規格化された基底演算子を構成している。上述のように、 $\langle \hat{I}_x | \hat{I}_x \rangle = 1$ や $\langle 2\hat{I}_x\hat{S}_z | 2\hat{I}_x\hat{S}_z \rangle = 1$ が成りたっており、また、 $\langle \hat{I}_x | 2\hat{I}_x\hat{S}_z \rangle = \text{Tr} \{ \hat{I}_x \cdot 2\hat{I}_x\hat{S}_z \} = 2\text{Tr} \{ \hat{I}_x^2 \otimes \hat{S}_z \} = 2\text{Tr} \{ \hat{E}/4 \otimes \hat{S}_z \} = 0$ より、 \hat{I}_x と $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ は直交する演算子である。

テキストの式(11.4)の 16 個の演算子が直交・規格化されていることを用いると、 $\text{Tr} \{ \hat{\sigma}(t) (\hat{I}_x + i\hat{I}_y) \}$ の計算などが容易に実行できる。

$$\begin{aligned} \langle M^+(t) \rangle &= \text{Tr} \{ \hat{\sigma}(t) (\hat{I}_x + i\hat{I}_y) \} = \cos(\Omega_I t) \cos(\pi J t) + i \sin(\Omega_I t) \cos(\pi J t) = \\ &= (1/2) \{ \cos(\Omega_I + \pi J)t + \cos(\Omega_I - \pi J)t \} + (i/2) \{ \sin(\Omega_I + \pi J)t + \sin(\Omega_I - \pi J)t \} \\ &= (1/2) (e^{i(\Omega_I + \pi J)t} + e^{i(\Omega_I - \pi J)t}) \end{aligned} \quad (5.24)$$

これが複素 FID 信号として観測されるので、スペクトルは共鳴周波数が $\Omega_I^\pm = \Omega_I \pm \pi J$ の 2 重線となる。結局、 \hat{I}_x 状態は J -結合を含む \hat{H} の下で t 時間展開すると、その FID 信号は同一符号の 2 重線となる。そのため、 \hat{I}_x は in-phase SQ(single quantum)-coherence と呼ばれる。

(iv) anti-phase SQ-coherence : $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ の FID 信号

一方、初期状態の I スピンの横磁化が $\hat{\sigma}(0) = 2\hat{I}_x\hat{S}_z$ の場合、 $\Omega_I\hat{I}_z$ で t 時間展開すると、 $\hat{\sigma}_2 = \cos(\Omega_I t) \cdot 2\hat{I}_x\hat{S}_z + \sin(\Omega_I t) \cdot 2\hat{I}_y\hat{S}_z$ 、さらに $2\pi J\hat{I}_z\hat{S}_z$ で t 時間展開すると $\hat{\sigma}_3 = \cos(\Omega_I t) \{ \cos(\pi J t) \cdot 2\hat{I}_x\hat{S}_z + \sin(\pi J t) \cdot \hat{I}_y \} + \sin(\Omega_I t) \{ \cos(\pi J t) \cdot 2\hat{I}_y\hat{S}_z - \sin(\pi J t) \hat{I}_x \}$ となる。さらに、I スピンの FID 信号として $\langle M^+ \rangle = \text{Tr} \{ \hat{\sigma}_3 (\hat{I}_x + i\hat{I}_y) \}$ を計算すると、

$$\begin{aligned} \langle M^+(t) \rangle &= \sin(\Omega_I t) \{ -\sin(\pi J t) \} + \cos(\Omega_I t) \{ i \sin(\pi J t) \} = \\ &= (1/2) \{ \cos(\Omega_I + \pi J)t - \cos(\Omega_I - \pi J)t \} + (i/2) \{ \sin(\Omega_I + \pi J)t - \sin(\Omega_I - \pi J)t \} \\ &= (1/2) \{ e^{i(\Omega_I + \pi J)t} - e^{i(\Omega_I - \pi J)t} \} \end{aligned} \quad (5.25)$$

が得られる。今度は $\Omega_I^\pm = \Omega_I \pm \pi J$ という周波数の 2 本の共鳴線の符号が正負に分かれるので、 $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ は anti-phase SQ-coherence と呼ばれる。

5) コヒーレンス移行：異種核スピンエコーと同種核スピンエコー

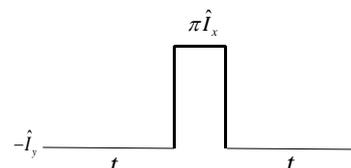
NMR スペクトルを得るため、スピンの位相を揃えるスピンエコーという操作が重要な意味

を持っている。1 スピン系か2 スピン系かによってその操作の内容が少し異なるので、2つの場合に分けて考察しよう。特に、2 スピン系の場合はコヒーレンス移行という2次元 NMR 法によって極めて重要なパルスとなるので、詳しく説明する。

(i) 1 スピン系のスピンエコー

スピンエコーとは90°パルスで横磁化にしたもの(例えば $-\hat{I}_y$)をハミルトニアン \hat{H} の下で t 時間展開し、つぎに180° $_x$ パルスを照射して、同じ t 時間経過後の状態を作成することをいう。この操作を演算子 \hat{U} で表現すると、 $\hat{U} = e^{-i\hat{H}t} e^{-i\pi\hat{I}_x} e^{-i\hat{H}t}$ となる。 $-\hat{I}_y$ にスピンエコーを適用した状態は $\hat{U}(-\hat{I}_y)\hat{U}^{-1}$ となる(下記の図参照)。演算子 \hat{A} の関数 $f(\hat{A})$ に対して成り立つ定理： $\hat{U}f(\hat{A})\hat{U}^{-1} = f(\hat{U}\hat{A}\hat{U}^{-1})$ を応用して、 $\hat{U} = e^{-i\hat{H}t} e^{-i\pi\hat{I}_x} e^{-i\hat{H}t}$ を計算すると、 \hat{U} をもっと簡単な形の演算子に変形する

ことができる(計算はテキスト p.30 参照)。例えば、 \hat{H} が



J -結合項を含まない孤立した1 スピン系の場合は、

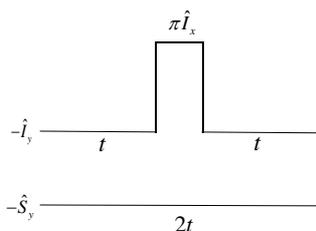
$\hat{H} = \Omega_z \hat{I}_z$ を代入すると、 $\hat{U} = e^{-i\Omega_z t} e^{-i\pi\hat{I}_x} e^{-i\Omega_z t}$ となるが、

$\hat{U} = e^{-i\Omega_z t} \left(e^{-i\pi\hat{I}_x} e^{-i\Omega_z t} e^{i\pi\hat{I}_x} \right) e^{-i\pi\hat{I}_x}$ と表し、()内の式に上記定理を用いて、 $\left(e^{-i\pi\hat{I}_x} e^{-i\Omega_z t} e^{i\pi\hat{I}_x} \right) = \exp\left(-i\Omega_z t \left(e^{-i\pi\hat{I}_x} \hat{I}_z e^{i\pi\hat{I}_x} \right)\right) = e^{i\Omega_z t}$ と書き直すと、 $\hat{U} = e^{-i\Omega_z t} e^{i\Omega_z t} e^{-i\pi\hat{I}_x} = e^{-i\pi\hat{I}_x}$ となる。つまり、孤立した1 スピンに照射したスピンエコーは、単に180° $_x$ パルスを適用したに過ぎないので、状態演算子は符号を変えるだけである、例えば $-\hat{I}_y$ 状態は

スピンエコーによって \hat{I}_y 状態に代わる。化学シフト値が異なる複数のプロトンを含むスピン系は $-\hat{I}_y$ という初期状態から t 時間経過すると、 $\Omega_z t \hat{I}_z$ によって位相が「ばらばら」になるが、 $-\hat{I}_y$ にスピンエコーパルスを照射した結果は \hat{I}_y となって、全てのプロトンが再び y 軸上に整列して位相が揃っている。それがスピンエコーと呼ばれる所以である。

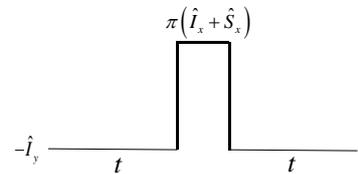
(ii) 2 スピン系のスピンエコー：異種核、同種核スピンエコー

つぎに J -結合でスピン結合した2 スピン系(I スピンとS スピン)に対するスピンエコーを考えてみよう。はじめに、両方のスピンを同時に90° $_x$ パルスで倒して $-\hat{I}_y$ 、 $-\hat{S}_y$ 状態にし、 \hat{H} で t 時間展開し、その後、I スピンにだけ180° $_x$ パルスを照射して t 時展開してスピンエコーさせ、S スピンは $2t$ 時間自由歳差運動させる。この状態を異種核スピンエコーという。例えば、I スピンが ^1H でS スピンが ^{15}N という異種核の場合、共鳴周波数が大きく異なり別々の発振器でパ



ルスを発生させるため、一方の核スピンのみだけ180°パルス照射することが可能になる（上図参照）。この操作を \hat{U} で表すと、 $\hat{H} = \Omega_I \hat{I}_z + \Omega_S \hat{S}_z + 2\pi J \cdot \hat{I}_z \hat{S}_z$ として、 $\hat{U} = e^{-i\hat{H}t} e^{-i\pi \hat{I}_x} e^{-i\hat{H}t}$ となる。上と同様に、 $\hat{U}f(\hat{A})\hat{U}^{-1} = f(\hat{U}\hat{A}\hat{U}^{-1})$ という定理を使ってこれを簡単化すると、 $\hat{U} = e^{-i\Omega_S 2t \hat{S}_z} e^{-i\pi \hat{I}_x}$ となる（計算はテキストP.32参照）。つまり、異種核スピンエコーの場合、Iスピンはスピンエコーによって状態の符号が変わるだけ、一方、SスピンはIスピンとのスピン結合が消えて時間 $2t$ だけ $\Omega_S \hat{S}_z$ の下で自由歳差運動したことになる。この操作はSスピン側から見ると、Iスピンとデカップリングして自由歳差運動させたといえる。この異種核スピンエコーは、HSQCスペクトルを測定するとき重要なパルス列となるので、そのときまた説明する。

もう一つ別に、同種核スピンエコーというパルス操作が存在する。例えば、スピン結合したプロトン対の場合（スピンIとSはどちらも ^1H とする）、スピンエコーのために 180°_x パルス照射すると、共鳴周波数が近接しているため両方ともそのパルスの影響を受ける。そのため同種核スピンエコーという。 ^{15}N と ^1H の場合でも、2つの発振器を用いて同時に両方の核スピンのみ 180°_x パルス照射すれば、同種核スピンエコーになる。この場合は $\hat{U} = e^{-i\hat{H}t} e^{-i\pi(\hat{I}_x + \hat{S}_x)} e^{-i\hat{H}t}$ となるが（右図参照）、同様に簡単化の手続きを施すと（この計算はテキスト



P.31を参照)、 $\hat{U} = e^{-i4\pi J \hat{I}_z \hat{S}_z} e^{-i\pi(\hat{I}_x + \hat{S}_x)}$ となる。この操作は、IスピンとSスピンに同時に 180°_x を照射し、その後

$2\pi J \cdot \hat{I}_z \hat{S}_z$ 項で $2t$ 時間展開することである。最初 $-\hat{I}_y$ であれば $-\hat{I}_y \frac{\pi \hat{I}_x + \pi \hat{S}_x}{4\pi J t \cdot \hat{I}_z \hat{S}_z} \hat{I}_y \frac{4\pi J t \cdot \hat{I}_z \hat{S}_z}{\cos(2\pi J t) \hat{I}_y - \sin(2\pi J t) 2\hat{I}_x \hat{S}_z}$ となる。従って、展開時間を $t = 1/(4J)$ に設定すると、 $-2\hat{I}_x \hat{S}_z$ という anti-phase SQ-coherence 状態になる。コヒーレンス移行を起こさせたいとき、この同種核スピンエコーパルス照射して、 $\hat{I}_x \hat{S}_z$ という状態を発生させ、さらにIスピンに 90°_y 、Sスピンに 90°_x パルス照射すると、 $\hat{I}_z \hat{S}_y$ という状態になり、コヒーレンスがIスピンからSスピンに移った状態を発生させることができる。2次元NMRスペクトルは、このようなコヒーレンス移行というテクニックを頻繁に用いて測定プログラムが構築されている。

第6章 多次元 NMR スペクトルとピーク帰属法

§15 多次元 NMR スペクトル

これまでは、核スピンの運動を量子力学的に追跡して NMR 現象を考察してきた。以下では、どんな NMR スペクトルを、どのようにして測定するのかという具体的な問題を考えてみよう。観測核の横磁化 (コヒーレンス) を FID 信号として検出し、それをフーリエ変換してスペクトルとして表示する。通常、プロトンを観測核としてプログラムを構成する。その理由はプロトンのスピン磁気モーメントが大きいので (γ の値が大きい)、NMR 信号の強度が強いからである。しかし、観測したい核スピンはプロトンだけではない。例えば、主鎖 NH 基の ^{15}N 核と ^1H 核の共鳴周波数を同時に測定できれば、非常に重要な情報を得ることができる。 ^1H 核のスペクトルを横軸上にプロットし、 ^{15}N 核のスペクトルを縦軸上に表示すると、1つの NH 基の情報を 2次元平面の 1点 (交差ピークと呼ぶ) で表示することができる。共鳴周波数が縮退した多数の ^1H 核が存在する場合、1次元のスペクトルでは重なり合って、どのプロトンからの信号なのか識別できない。しかし、 ^1H の共鳴周波数は同じでも、それに共有結合した ^{15}N 核の共鳴周波数が異なれば、2次元スペクトルにすると平面上の異なった位置に交差ピークが現れる。つまり、1次元スペクトルでは縮退していたものが、2次元目に展開することによってその縮退が解けたことを意味する。これは ^{15}N - ^1H HSQC スペクトルと呼ばれている。そのようなスペクトルを得るためには、 t_1 と t_2 という 2次元の時間軸に依存する FID 信号 $f(t_1, t_2)$ を測定する必要がある。その方法を以下で考察しよう。

1) 2次元 FID 信号: $f(t_1, t_2)$ を入手するための方法

例えば ^{15}N - ^1H HSQC スペクトルの場合、 ^{15}N 核 (S スピン) の Lamor 周波数 Ω_S に依存し、かつ ^1H 核 (I スピン) の周波数 Ω_I にも依存する 2次元の FID 信号を観測する必要がある。つまり、2時間軸 t_1 と t_2 に依存する FID 信号: $f(t_1, t_2)$ を入手する方法が 2次元 NMR 測定法である。例えば、 ^{15}N 核のスピンを横磁化 (\hat{S}_x) にし、スピン結合した ^1H 核のスピン \hat{I}_z との $\hat{I}_z \hat{S}_x$ という anti-phase SQ coherence を作り、それを t_1 時間展開すると、 $\Omega_S t_1$ に依存するスピン状態 $\hat{\sigma}(t_1)$ を生成することが出来る。つぎにコヒーレンスを S スピンから I スピンに移行させ、 ^1H 核の FID 信号を t_2 時間軸の関数として観測すると、それは $\Omega_S t_1$ で振幅変調された $\Omega_I t_2$ で振動する FID 信号: $f(t_1, t_2)$ となる。つまり、いろいろな値に設定された時間 t_1 に対してプログラムを実行し、 ^1H 核の FID 信号を観測して記録すれば $f(t_1, t_2)$ が得られる。それを t_1 軸と t_2 軸に関してフーリエ変換すれば、2次元周波数軸平面上の交点 $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_S, \Omega_I)$ に交差ピークが現れる。それが 2

次元 NMR スペクトルである。2 時間軸上の FID 信号 $f(t_1, t_2)$ を入手する方法には様々なものがあり、COSY や NOESY というパルスプログラムが開発されることによって、タンパク質 NMR が確立してきた。上述のパルスプログラムの説明はその原理を知る目的だけのもので、実際の手続きには、もう少し複雑な工夫が施されている。はじめに、最も重要な ^{15}N - ^1H HSQC スペクトルについて詳しく説明しよう。

2) HSQC スペクトルの測定原理

HSQC とは Hetero Nuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy の略称である。異種核スピン間の J -結合を利用して、共有結合で隣接している核スピン間の NMR 現象を 2 次元 NMR スペクトルとして測定する方法である。 ^{15}N を含む培地で培養された菌体からタンパク質を抽出すると、一様に ^{15}N 置換された試料が得られる。ポリペプチド主鎖 NH 基の NMR 測定に最適の方法である。

図 6-1 は HSQC スペクトルを測定するためのパルスプログラムを示している。異種核を励起するため、I を ^1H 、S を ^{15}N とすると、パルスプログラムのチャートも 2 段になる。 ^{15}N の磁気角運動量比である γ_{N} は ^1H に対する γ_{H} の 1/10 程度であり、共鳴周波数が大きく異なるため、核スピンを励起する rf-発振器も 2 つ装備した分光器が必要になる。各パルス列に特徴的な役割があるので、A~E までの期間に分けて説明しよう。

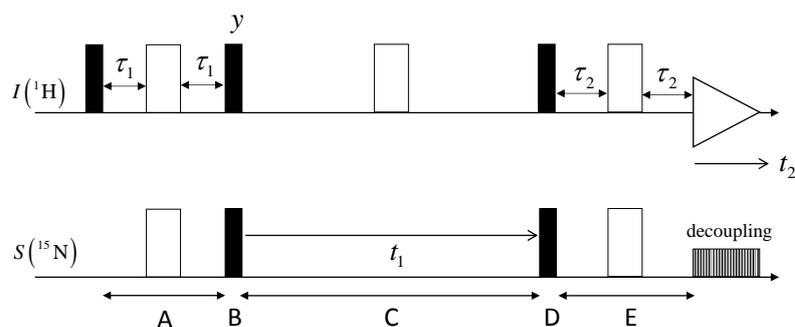


図 6-1 HSQC のパルスプログラム。白色のパルスは 180°_x パルスを表す。黒色のパルスは 90°_x であるが、I スピンへの第 3 のパルスは 90°_y である。FID データ取得時に S スピンに照射される矩形の縦縞のパルスは広帯域デカップリングと呼ばれる。

A 期：スピン状態演算子 $\hat{I}_x \hat{S}_z$ を作成するための準備期：

^1H に 90°_x パルスを照射し続いて両方の核に 180°_x パルスを照射してスピンエコーさせる。同種核スピンエコーなので、オペレータは $\hat{U} = e^{-i(4\pi J\tau_1)\hat{I}_z \hat{S}_z} e^{-i\pi(\hat{I}_x + \hat{S}_x)}$ と表され、

$\tau_1 = 1/4J$ に設定すると、A 期の最後のスピン状態は $\hat{\sigma}_A = \hat{U}(-\hat{I}_y)\hat{U}^{-1} = -2\hat{I}_x\hat{S}_z$ となる。

B 期 : I スピンから S スピンへのコヒーレンス移行 :

^1H に 90°_y パルス、 ^{15}N に 90°_x パルスを照射すると、 $\hat{\sigma}_B = -2\hat{I}_z\hat{S}_y$ となる。 $-\hat{S}_y$ という項も発生するが、不必要な演算子の項は位相回しというような方法で消去することができるので、今後は必要な項だけ残して説明する。

C 期 : S スピンの共鳴周波数 Ω_S で t_1 軸をラベル :

核スピン I だけに 180° パルスを照射して異種核スピンのエコーさせる。S スピンは I スピンからデカップリングして周波数 Ω_S で t_1 時間展開する。つまり、 $\hat{\sigma}_B$ に $\hat{U} = e^{-i\Omega_S t_1 \hat{S}_z} e^{-i\pi \hat{I}_x}$ を作用させ、 $\hat{\sigma}_C = \cos(\Omega_S t_1) \cdot 2\hat{I}_z\hat{S}_y - \sin(\Omega_S t_1) \cdot 2\hat{I}_z\hat{S}_x$ となる。

D 期 : ^1H 核で観測するために、S スピンから I スピンへコヒーレンスバック :

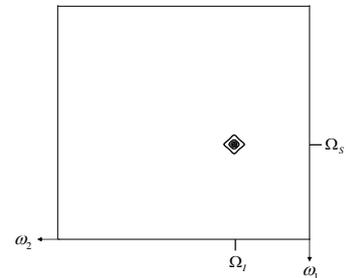
両スピンの 90°_x パルスを照射する。 $\hat{\sigma}_D = -\cos(\Omega_S t_1) \cdot 2\hat{I}_y\hat{S}_z + \sin(\Omega_S t_1) \cdot 2\hat{I}_y\hat{S}_x$ となるが、 $2\hat{I}_y\hat{S}_x$ という多量子コヒーレンスの項は FID 信号を発生しないので無視し、 $2\hat{I}_y\hat{S}_z$ という I スピンの anti-phase SQ coherence 状態だけに注目してよい。

E 期 : ^1H の FID 信号を 1 重線として観測するため $\hat{I}_y\hat{S}_z$ を \hat{I}_x に変換 :

$\tau_2 = 1/4J$ として同種核スピンのエコーを照射。 $\hat{\sigma}_D$ に $\hat{U} = e^{-i4\pi J \tau_2 \hat{I}_z \hat{S}_z} e^{-i\pi(\hat{I}_x + \hat{S}_x)}$ を作用させると $\hat{\sigma}_E = \cos(\Omega_S t_1) \cdot \hat{I}_x$ が得られる ($\hat{I}_x\hat{S}_y$ のような多量子コヒーレンスは FID 信号を発生しないので無視)。その結果、I スピンの FID 信号の観測時に S スピンに照射する広帯域デカップリングによって、 \hat{I}_x による共鳴線が 1 重線として観測される。

結局、HSQC パルスプログラムの結果、 $\hat{\sigma}_E$ 中の \hat{I}_x 項だけが S スピンとデカップリングされて t_2 軸上の FID 信号を与える。従って、それをフーリエ変換した ω_2 軸 (横軸) 上のスペクトルは周波数 Ω_I の位置に 1 重線として現れる。

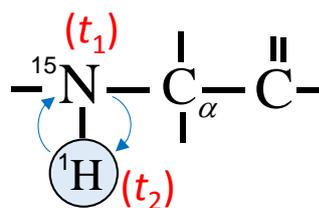
一方、 $\hat{\sigma}_E$ は $\cos(\Omega_S t_1)$ で振幅変調されているが、これも I スピンとデカップリングして t_1 時間展開したもののなので、 t_1 軸に関してフーリエ変換したのも 1 重線となる。結局、NH 基の交差ピークは、どちらの周波数軸に対しても 1 重線で、2 次元平面上の $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_S, \Omega_I)$ の位置に現れる。スペク



トルの模式図を右に示したが、1 個の NH 基当たり 1 個の明瞭な吸収型の交差ピークが現れる非常にシンプルなものである。

スピンの運動を精確に追跡して描写すると上記のようになる。スピン状態 $\hat{\sigma}(t_1)$ はスピネコー法などによって意図的に操作し、また不必要な項は位相回しなどによって消去する。それが2次元 HSQC スペクトルである。その他の2次元 NMR スペクトルにおいても同様にスピンの位相を巧妙に制御して測定が実行されているが、様々なスペクトル測定法に対してそれを詳細に述べると冗長になるので、今後は、コヒーレンス移行の状況だけを追跡して説明することに留める。

^{15}N - ^1H HSQC スペクトルの測定原理をペプチド鎖の上で説明してみよう。観測核は青丸で示した ^1H である。それを I としスピン結合した ^{15}N を S と表す。A 期で作成した anti-phase SQ-coherence $\hat{I}_x\hat{S}_z$ に 90° パルスを打ってコヒーレンスを ^{15}N に移し、 t_1 だけ時間展開すると、 ^{15}N 核の共鳴周波数 Ω_S で t_1 軸がラベルされる ($\cos\Omega_S t_1$ と振幅変調がかかる)。続いて ^1H にコヒーレンスバックして、FID 信号を観測すると、時間軸 t_2 は ^1H の共鳴周波数 Ω_I で振動する信号となる。FID 信号 $f(t_1, t_2)$ を t_1 軸と t_2 軸でフーリエ変換し、 (ω_1, ω_2) という2次元平面上にスペクトルの等高線をプロットすると、 (Ω_S, Ω_I) という交点の位置に鋭いピークが現れる。これを ^{15}N - ^1H の交差ピークとよぶ。



3) HSQC スペクトルの事例

HSQC スペクトルの縦軸 (F1 軸)、横軸 (F2 軸) は共鳴周波数 Ω ではなくて、化学シフト δ で示され、F1 軸の ^{15}N 核の化学シフト $\delta_{^{15}\text{N}}$ は通常 100 ~ 130 ppm の範囲に広がる。一方、F2 軸の ^1HN 核の化学シフト $\delta_{^1\text{HN}}$ の範囲は 6.5 ~ 10.0 ppm である。事例としてニワトリ・リゾチームの HSQC スペクトルを図 6-2 に示す。これを見ると、NMR スペクトルが2次元化されたことの意義がよく分かる。すなわち、129 個の主鎖 NH 基由来の交差ピークは、2次元化されているため重なり合うことなく明瞭に分離して識別出来る。しかし、これらの交差ピークが全て F2 軸上に縮退してしまったとすると、多くのピークは重なり合って識別できなくなることがよく分かる。スペクトルを2次元化することの意義は、F2 軸上に縮退したプロトン NMR のピークを ^{15}N の化学シフトで F1 軸上に展開して高分解能にすることに対応している。

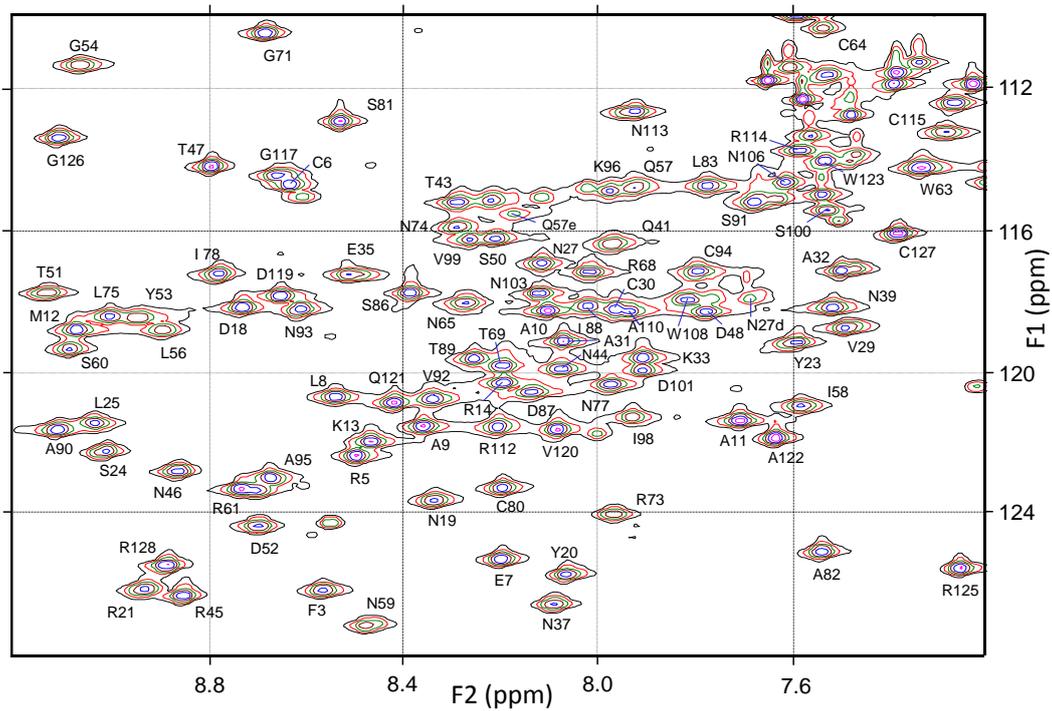
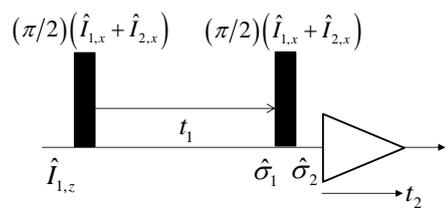


図 6-2 リゾチームの ^{15}N - ^1H HSQC スペクトル。F1 軸は ^{15}N 核の化学シフトを表す。横軸はアミドプロトンの化学シフトである。交差ピークの数字は残基番号を示し、例えば R73 は残基番号 73 の Arg の ^1HN - ^{15}N 交差ピークを表す。 ^{15}N ラベルされたニワトリ・リゾチームは組み換え DNA を用いて大腸菌で発現されたタンパク質である。従って、天然の卵白リゾチームとは N 末端に残った Met 残基の分だけ異なる。NMR スペクトルのデータは BMRB Entry ID 7160 に登録されている。

4) COSY スペクトルと DQF-COSY スペクトル

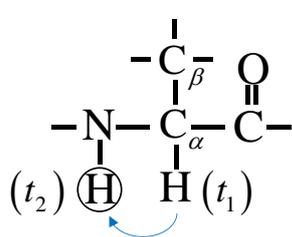
(i) COSY スペクトルの測定原理

タンパク質の NMR スペクトルには HSQC スペクトルの他にも COSY, NOESY と呼ばれる 2 次元スペクトルが常套手段としてよく測定される。図は COSY スペクトルを測定するためのパルスプログラムを示している。最もシンプルな 2 次元 NMR 測定法で 2 つの 90°_x パルスから構成されている。パルス間の時間 t_1 を変数とし、時間軸 t_2 上の関数 $f(t_1, t_2)$ として



FID 信号を観測する。COSY とは Correlation Spectroscopy の略である。タンパク質内のスピン結合したプロトン間のコヒーレンス移動を利用して、2 つのプロトンの共鳴周

波数を 2 次元スペクトル上の交差ピークとして同時に検出することができる。左下の図はアミノ酸残基の概略図である。スピン 1 を $C_\alpha H$ プロトン ($^1HC_\alpha$ と略記)、スピン 2 を主鎖 NH プロトン (1HN と略記) として、2 次元スペクトルを得るために重要なコヒーレンス移動の様子を説明する。 $^1HC_\alpha$ と 1HN はスピン結合した 2 スピン系である。どちらもプロトンなので、核スピンを表す演算子を、 \hat{I}_1, \hat{I}_2 とする。第 1 の 90°_x パルスでスピン 1 ($^1HC_\alpha$) が xy 平面上に倒れ、 $-\hat{I}_{1,y}$ という状態になる。その後、スピン 1 の横磁化は周波数 Ω_1 で時間 t_1 だけ歳差運動して、パルスプログラム上に示した $\hat{\sigma}_1$ という状態になる。スピン 1 とスピン 2 の間の J -結合項を含んだハミルトニアンの下で時間展



開するので、 $\hat{\sigma}_1$ には $\hat{I}_{1,x}, \hat{I}_{1,y}$ の他にスピン 2 の演算子 \hat{I}_2 とカップリングした $\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,z}, \hat{I}_{1,y}\hat{I}_{2,z}$ という状態が含まれている。この状態がコヒーレンス移行という重要な役目を果たすことを説明する前に、これらの項の振幅にはスピン 1 の横磁化の歳差運動 (t_1 時間展開という) によって生じた $\cos \Omega_1 t_1$ あるいは $\sin \Omega_1 t_1$

という振幅変調がかかっていることに注意する。つまり、 t_1 軸はスピン 1 の共鳴周波数 Ω_1 で「ラベル」されていると表現される。つぎに、第 2 の 90°_x パルスを照射すると、状態演算子 $\hat{\sigma}_2$ は、 $\hat{I}_{1,z}, \hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,y}$ と $\hat{I}_{1,x}, \hat{I}_{1,z}\hat{I}_{2,y}$ という 4 つの演算子項を含む状態に変わり、その FID 信号を観測するのであるが、 $\langle M^+ \rangle = \text{tr} \{ \hat{\sigma} \hat{M}^+ \}$ によって複素磁化ベクトルの期待値を計算するさい、「FID 信号 $\langle M^+ \rangle$ を発生する演算子は必ず 1 量子演算子である」という重要な定理がある。従って、ゼロ量子の $\hat{I}_{1,z}$ および $\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,y}$ という 2 量子状態は考慮しなくてよい。残り 2 つの状態は 1 量子演算子 (どちらか一方だけが横磁化) である。特に、 $\hat{I}_{1,z}\hat{I}_{2,y}$ は第 2 のパルスでスピン 1 から 2 にコヒーレンスが移行 (図の青矢印) した重要な状態を表す項である。横磁化はスピン 2 が担っているので、 t_2 軸上では周波数 Ω_2 で振動する FID 信号が得られる。この信号は t_1 軸上で $\cos(\Omega_1 t_1) \cdot \sin(\pi J t_1)$ と振幅変調されているので、2 次元フーリエ変換すると、 ω_1 軸上で Ω_1^\pm の位置、 ω_2 軸上で Ω_2^\pm の位置に交差ピークが現れる ($\hat{I}_{1,z}\hat{I}_{2,y}$ は anti-phase SQ-coherence なので t_1 軸でも t_2 でも異符号の 2 重線となる)。つまり、スピン 1 と 2 の共鳴周波数を同時に決定することができた。コヒーレンス移行の重要性をこの例から知ることができる。

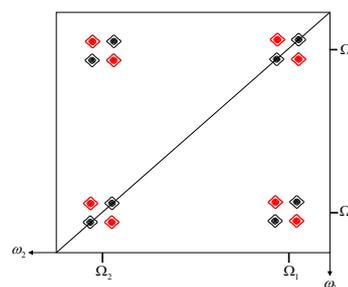
最も単純な COSY というパルスプログラムは、交差ピークを得るという目的にはかなったものであるが、共存する $\hat{I}_{1,x}$ という項も 1 量子状態として観測される。この項

は ω_2 軸上でも Ω_1^\pm の位置で同符号の2重線になるので「対角ピーク」と呼ばれる。しかし、前述の $\hat{I}_{1,z}\hat{I}_{2,y}$ という交差ピークは、 t_2 軸の信号がy成分であり t_1 軸に関する振幅変調項が $\cos(\Omega_1^\pm t_1)$ である。フーリエ変換後の交差ピークを t_1, t_2 軸に関して吸収型に設定して変換すると、対角ピークを与える $\hat{I}_{1,x}$ は t_2 軸の信号がx成分なので ω_2 軸は分散型のピークとなり、さらに、 t_1 軸に関する $\hat{I}_{1,x}$ の振幅変調項が $\sin(\Omega_1^\pm t_1)$ なので ω_1 軸に関する分散型のピークとなる (FID信号のフーリエ変換後のピークが吸収型になるか分散型になるかに関しては、テキストのp.40-44の説明を参照)。分散型のピークは長い裾野を引くため、その近傍にある重要な吸収型の交差ピークを隠してしまう。タンパク質は多数の共鳴線が密集しているので、これは重大な欠陥である。その欠陥を克服するために、DQF-COSYというパルスプログラムが開発された。

(ii) DQF-COSY スペクトルの測定原理

すでに述べたように、第2のパルス照射直後の $\hat{\sigma}_2$ には、ゼロ量子、1量子と多量子状態 $\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,y}$ が存在した。 $\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,y} = (1/2)\{(\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,y} + \hat{I}_{1,y}\hat{I}_{2,x}) + (\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,y} - \hat{I}_{1,y}\hat{I}_{2,x})\}$ と書き換えられ、第1項は2量子、第2項は0量子演算子である。第2の90°パルスの「位相回し」(パルスの位相をx軸、y軸、-x軸のように様々な位相を変えて照射し、得られたFID信号を積算する方法)によって2量子演算子以外の項を完全に消し去ることができる。その結果、 $\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,y} + \hat{I}_{1,y}\hat{I}_{2,x}$ という2量子状態の演算子だけが残る。そのため、このパルスプログラムはDQF(Double Quantum Coherence Filtered)-COSYと呼ばれる。特定のコヒーレンス状態だけを選択的に残す「コヒーレンス選択」という技法はNMR分光法における重要な概念であるが、その説明は省略する(テキストの第III章を参照)。2量子コヒーレンスはFID信号を発生しないので、第2のパルス照射直後に第3の90°_xパルスを照射すると、 $\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,z} + \hat{I}_{1,z}\hat{I}_{2,x}$ という1量子状態になり、FID信号が観測できる。すでにCOSYのとき述べたように、 t_1 軸上では周波数 Ω_1^\pm で振幅変調されている。 $\hat{I}_{1,x}\hat{I}_{2,z}$ という第1項はスピン1がコヒーレンスを持つ状態なので、 t_2 軸上でも周波数 Ω_1^\pm の信号となり、対角ピークを与える。一方、 $\hat{I}_{1,z}\hat{I}_{2,x}$ という第2項は t_2 軸上で周波数 Ω_2^\pm の信号となるので、交差ピークが得られる。そして重要なことは、対角ピーク項も交差ピーク項も、 t_1 軸の振幅変調は同じ関数 $\sin(\Omega_1^\pm t_1)$ を伴っているので、フーリエ変換後の ω_1 軸のピークを対角項も交差項も吸収型にすることが出来る。さらに、 t_2 軸の信号に関する、どちらも横磁化はx成分なので、対角ピークも交差ピークも吸収型にす

ることができる。つまり、 ω_1 軸でも、 ω_2 軸でも同時に吸収型の鋭い共鳴ピークとして表現できるので、COSY スペクトルの欠陥が克服できた事になる。DQF-COSY のスペクトルは交差ピークも対角ピークも、赤色（負）と黒色（正）の4つの吸収型ピークとして表される。



$^1\text{HC}_\alpha$ をスピン 1 として考えてきたので、2次元スペクトル上の対角ピークは $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_{\text{HC}}^\pm, \Omega_{\text{HC}}^\pm)$ となり、交差ピークは $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_{\text{HC}}^\pm, \Omega_{\text{HN}}^\pm)$ の位置に現れる。これまで最初のパルスで 90° 倒れたスピンを $^1\text{HC}_\alpha$ として議論してきたが、それが ^1HN であっても同様の議論が成り立つ。このときは、スピン 1 が ^1HN 、スピン 2 が $^1\text{HC}_\alpha$ に対応するので、2次元スペクトル上の対角ピークは $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_{\text{HN}}^\pm, \Omega_{\text{HN}}^\pm)$ となり、交差ピークは $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_{\text{HN}}^\pm, \Omega_{\text{HC}}^\pm)$ の位置に現れる。その結果、DQF-COSY スペクトルを模式的に表すと、上図のように、1つのスペクトルを表す交点の位置に4本の正負の吸収型ピークが現れる特徴的なパターンを示す（一般に $\Omega_{\text{HC}}^\pm < \Omega_{\text{HN}}^\pm$ が成り立つ）。アミノ酸残基内の ^1HN と $^1\text{HC}_\alpha$ の交差ピークを考察したが、残基内にはスピンスピン結合する他のプロトン対も存在する。例えば、 $^1\text{HC}_\alpha$ と $^1\text{HC}_\beta$ 、 $^1\text{HC}_\beta$ と $^1\text{HC}_\gamma$ などである。

5) DQF-COSY スペクトルの実例

DQF-COSY スペクトルの測定例を2つ示してその意味を考えてみよう。例はニワトリ・リゾチームに対して得られた2次元スペクトルである。図6-3はNH-C α H領域の交差ピークを表している。測定原理の説明では、NMR スペクトルの周波数軸を角振動数 ω で表したが、実際の NMR スペクトルでは Hz 単位の周波数に変換し、さらに ppm 単位の化学シフト δ で表すので、周波数軸を F1、F2 軸と名付けた。横軸 (F2 軸) は NH プロトン領域、縦軸 (F1 軸) は C α H プロトン領域を表している。赤と黒で表された4つのピークで一つの交差ピークを表しているので、ピークを間違える可能性が少ない。F2=7.42 ppm, F1=4.36 付近に 34aN と名付けられた交差ピークが見つかる。34は残基番号を表し、残基 F34 内の ^1HN の化学シフトが 7.42 ppm、 $^1\text{HC}_\alpha$ の化学シフトが 4.36であることを示している。もちろん、ピーク帰属が未定の状態では交差ピークは何も情報を与えないが、もし残基 F34 の ^1HN の化学シフトが 7.42 ppm であるとい

う確証が得られれば、F34の $^1\text{HC}_\alpha$ の化学シフトが4.36であることが確定する。

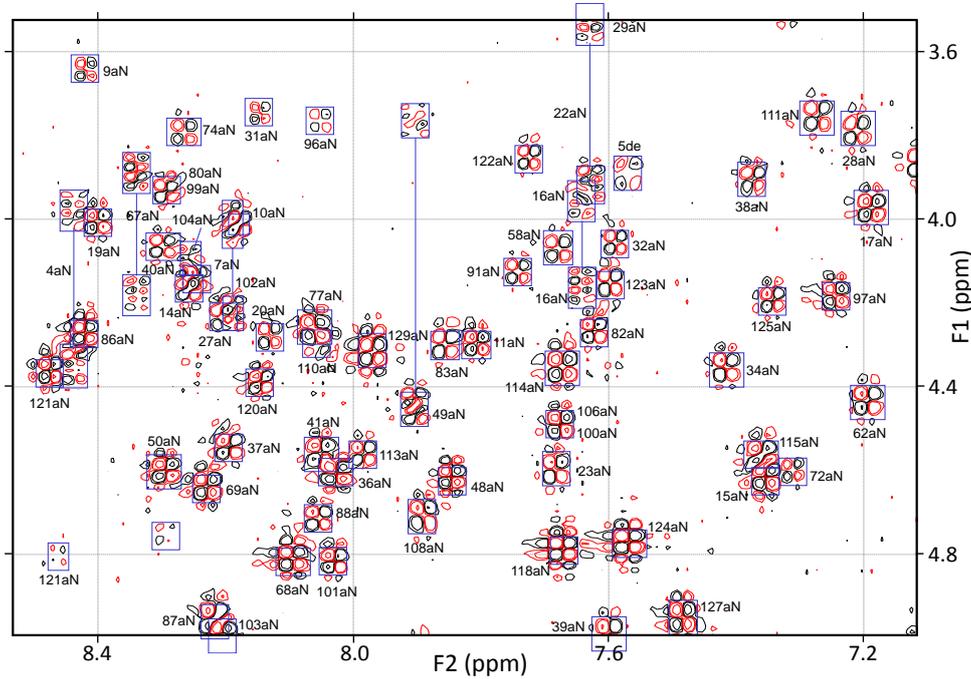
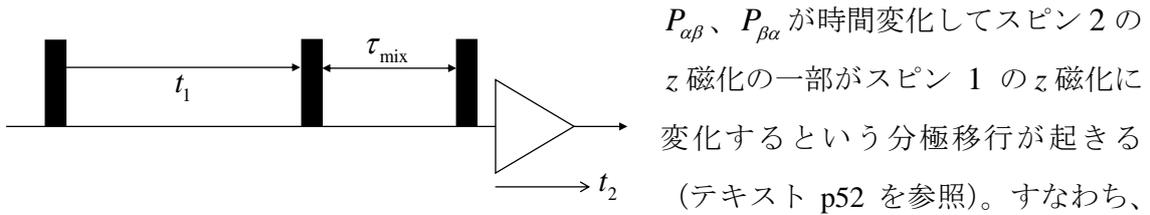


図 6-3 DQF-COSY スペクトルの NH-C α H 領域。図中の赤と黒のピーク合計 4 つで 1 つの交差ピークを表す。交差ピークの名前は数字が残基番号を表し、aN は αN を意味している。例えば 34aN は残基 F34 内の ^1HN - $^1\text{HC}_\alpha$ の交差ピークを表す。

一枚の DQF-COSY スペクトル上には、NH-C α H 領域だけでなく 0~10 ppm にわたる他の領域においても交差ピークが現れる。図 6-4 は DQF-COSY スペクトルの C α H-C β H 領域を示している。この場合も、C α H プロトンのピーク帰属が出来ていれば、C β H プロトンの化学シフトが分かることになる。このように DQF-COSY スペクトルは、交差ピークを用いて同一残基内の水素原子の化学シフトを NH 基から順に側鎖の末端に向かって決めていくことが出来るので、貴重な情報源である。特にタンパク質の構造を考察する場合には、側鎖の水素原子間の距離情報が重要になる。なぜなら、残基間接触は多くの場合側鎖間で起きるので、側鎖の水素原子のピーク帰属は大切な作業である。しかし、ペプチド結合をまたいだ 2 つのアミノ酸残基間のプロトンは、共有結合上 4 つ以上離れているため検出可能なスピンスピン結合が存在しない。従って、DQF-COSY スペクトルにおいて交差ピークが検出されるプロトン対は必ず同一残基内に限られる。これはピーク帰属を行うさい重要な情報である。§16 で述べるが、NH 基のプロトンの化学シフトは 3 次元の HSQC-NOESY-HSQC というスペクトルを用いて高い確率で連

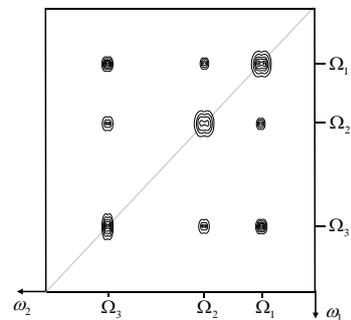
平衡状態における各スピンの z 磁化を表すことができる。例えば、スピン 1 の z 磁化は、 $\langle I_{1,z} \rangle = (1/2)(P_{\alpha\alpha} + P_{\alpha\beta} - P_{\beta\alpha} - P_{\beta\beta})$ である。パルス照射によって励起状態に上がった 2 スピン系は、時間経過とともに元の平衡状態に戻ろうとするが、その緩和過程において、2 つのスピン間の双極子相互作用によって $\alpha\beta$ 状態が $\beta\alpha$ 状態に遷移する交差緩和が起きる (その逆も可)。この現象を NOE (Nuclear Overhauser Effect) という。その結果、



Solomon の方程式はパルス照射によって生じた $\Delta I_{1,z}$ が緩和過程によって時間変化する過程を表し、 $d\Delta I_{1,z}(t)/dt = -R_{z,1}\Delta I_{1,z}(t) - \sigma_{1,2}\Delta I_{2,z}(t)$ と表される。第 1 項は自発緩和、第 2 項は交差緩和と呼ばれる。 $d\Delta I_{2,z}(t)/dt$ にも同様の微分方程式が成り立つ。 $\Delta I_{1,z}$ 、 $\Delta I_{2,z}$ はスピン 1 あるいは 2 の z 磁化の平衡状態からのずれである。 $\sigma_{1,2}\Delta I_{2,z}$ の項は、スピン 2 の z 磁化がスピン 1 の z 磁化に混じることを表している。スピン 2 に対しても同様、緩和過程が進行するにつれて、その z 磁化にはスピン 1 の z 磁化が混じってくる。NOE 相互作用しているスピン間の磁化移行という現象である。それを利用して 2 つのスピン間の交差ピークを検出する方法が NOESY スペクトルの測定原理である。パルスプログラムを参照しながら測定原理を考察しよう。最初の 90°_x パルスでスピンの z 磁化が 90° 倒れると、スピン系はエネルギーの高い励起状態に上がる。その後の展開期 (t_1 時間) において、スピン 1 の横磁化は歳差運動によって磁化の y 成分に $\cos(\Omega_1 t_1)$ という振幅変調がかかり、続く第 2 の 90°_x パルスによって再び z 磁化に戻されたとき、その大きさは $I_0 \cos(\Omega_1 t_1)$ となる。スピン 2 に対しても同じことが起きているので、スピン 2 の z 磁化も $I_0 \cos(\Omega_2 t_1)$ となる。すなわち、両スピンに対して、時間軸 t_1 を自分自身の化学シフト周波数でラベルした z 磁化を作ることが展開期の役割である。この時点における $\hat{\sigma}$ の状態は COSY のときと同じで、コヒーレンス次数が 1 や 2 という状態も存在している (COSY は 1 量子状態を観測し、DQF-COSY では 2 量子状態を選択的に残した)。NOESY 測定法では「位相回し」によって、0 量子状態の z 磁化の項 $\hat{I}_{1,z}$ と $\hat{I}_{2,z}$ だけを残して、他のスピン演算子の項を消去する。従って、次の混合期 (τ_{mix}) においては、スピン 1 と 2 の間で起きる分極移行だけを考慮すればよい。最も効率のよい分極移行が

起きるように混合時間 τ_{mix} (100~200 ms 程度) を設定する。その結果、スピン 1 の z 磁化はスピン 1 の自発緩和による項と、スピン 2 からの交差緩和による項の和で表される。自発緩和項は $\cos(\Omega_1 t_1)$ 、交差緩和項は $\cos(\Omega_2 t_1)$ と振幅変調されているので、スピン 1 は t_1 軸において、 Ω_1 と Ω_2 という周波数成分をもつ。この z 磁化は第 3 の 90° パルスで再び横磁化に変換され、その FID 信号が t_2 軸上のデータとして観測・記録される。スピン 1 の FID 信号は Ω_1 で振動しているため、スピン 1 由来の FID 信号をフーリエ変換すると、 ω_1 軸上には Ω_1 と Ω_2 という周波数成分をもち、 ω_2 軸上では Ω_1 である。スピン 2 に対しても同じことが起きているので、得られた 2 次元 NOESY スペクトルには、 $\omega_1 = \omega_2 = \Omega_1$ あるいは $\omega_1 = \omega_2 = \Omega_2$ という対角ピークと、 $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_1, \Omega_2)$ あるいは $(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_2, \Omega_1)$ という位置に交差ピークが現れる (NOESY スペクトルの模式図参照)。模式図の Ω_3 の位置に現れる交差ピークは、それぞれのスピンの空間的に近接している他のスピンの交差ピークである。

一般に、NOE 効果が顕著に現れるスピンは距離的に 5\AA 以内に存在するプロトンである。交差緩和を起こす双極子相互作用のエネルギーがスピン間距離を r として $1/r^6$ に比例しているため、距離が離れると分極移行の効率が急激に減少するからである。これはタンパク質の構造情報を与える上で非常に重要である。すなわち、NOE 相互作用しているプロトン対の残基を決定すれば、配列上遠く離れた残基対が空間的に近接 (接触) しているという情報を与えるからである。それはタンパク質の立体構造を考える上で重要な知見となる。NMR の構造情報だけからタンパク質の立体構造を決定することを可能にするのも、NOESY スペクトルのおかげである。



7) 2次元 NOESY スペクトルの実例

2次元 NOESY スペクトルの測定例を一つ示そう。図 6-5 は F1 軸が 1.0~2.4 ppm、F2 軸が -0.8 ~ 0.8 ppm の領域の NOESY スペクトルである。側鎖末端の水素原子は、配列上遠く離れた残基間の空間的接触に関与している場合が多いので、この領域の交差ピークは、タンパク質の立体構造を考察するとき重要な情報をもたらす。NOESY スペクトル上で遠距離相互作用している交差ピークの帰属が出来るためには、側鎖末端に位

元 NOESY スペクトルは、交差ピークの数が多く、重なり合っただけ十分な分解能が得られない。従って、NOESY スペクトルを 3 次元に拡張して、ピークの重なりを避ける方法が 3D NOESY-HSQC という測定法である。HSQC パルス列をパルスプログラムの一部に組み込んで、観測核の ^1H 核から ^{15}N 核へのコヒーレンス移行を起こし、 t_2 軸をその Ω_{N} で周波数ラベルした後、再び ^1HN にコヒーレンスバックして、その FID 信号を観測する。その結果得られる 3 次元スペクトルから t_2 軸の値が Ω_{N} となるスライススペクトルを切り出すと、 ^{15}N が特定の値となる ^1HN 核に近接した ^1H 核の NOE スペクトルだけが表示される。つまり、重なり合った 2 次元 NOE の交差ピークを ^{15}N の F2 軸方向に展開してピークの縮退を回避し、 ^{15}N の周波数が特定の値となる ^1HN 核の $d_{\alpha\text{N}}$ や d_{NN} 相関だけを検出する。この方法は、NH プロトンの 1 次元 NMR スペクトルを 2 次元目の ^{15}N 軸方向に引き出して共鳴線の縮退を解いた 2 次元 HSQC スペクトルと基本的に同じ戦略である。3 次元スペクトルの測定法としては、以下の節で HSQC-NOESY-HSQC というパルスプログラムを紹介するので、3D NOESY-HSQC の説明は省く。

d_{NN} あるいは $d_{\alpha\text{N}}$ 相関は隣接残基間の情報なので、ピーク帰属を遂行する上でも非常に重要である。どれか 1 つの主鎖 NH プロトン (^1HN) が特定残基に帰属されたとすると (例えば残基番号 20 とする)、同一残基内の ^1HN - $^1\text{HC}_{\alpha}$ 交差ピーク (DQF-COSY の情報) から、残基 20 の $^1\text{HC}_{\alpha}$ の化学シフトが決まり、 $d_{\alpha\text{N}}$ 相関の情報から残基 21 の ^1HN の化学シフトが確定し、つぎに残基内 ^1HN - $^1\text{HC}_{\alpha}$ 交差ピークから、残基 21 の $^1\text{HC}_{\alpha}$ の化学シフトが確定し、また次の $d_{\alpha\text{N}}$ 相関から残基 22 の ^1HN の化学シフトが決まる。 d_{NN} 相関に関しても同様のことが成り立って、ある残基の ^1HN の化学シフトが決まれば、連鎖的に次々と ^1HN , $^1\text{HC}_{\alpha}$ の化学シフトが決まっていく。これを主鎖プロトンの連鎖帰属という。

§16 ピーク帰属の実際 : HSQC-NOESY-HSQC スペクトル

1) 3 次元 HSQC-NOESY-HSQC スペクトルの測定原理

隣接した 2 つの NH 基を考える。隣接してなくても空間的に近接していれば同じ議論は成り立つが、ピーク帰属のことを考慮して隣接している場合を考える。図 6-6 は HSQC-NOESY-HSQC パルスプログラムの概略を表している。名前が長いので本書の中では H-N-H プログラムと略称することもある。図 6-6 の右に示したペプチド主鎖の

図は、H-N-H パルスプログラムによるコヒーレンス移行と t_1 , t_2 , t_3 軸の周波数ラベルの様子を要約している。最初に N_AH 基に HSQC パルスが照射された（もちろん全ての NH 基は同様にパルス照射の影響を受ける）として、コヒーレンス移行の様子を追跡し、観測核は青丸で囲った 1HN_B として説明する。

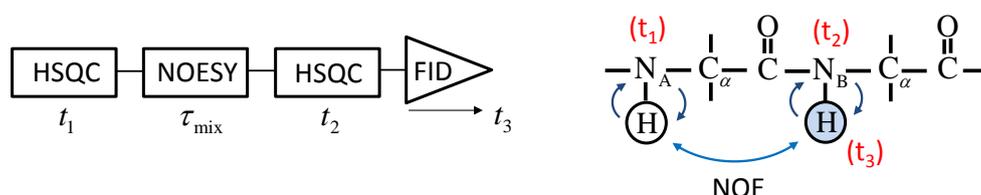


図 6-6 HSQC-NOESY-HSQC パルスプログラムの概略とペプチド主鎖内のコヒーレンス移行。H-N-H プログラムは 2D-HSQC パルスと 2D-NOESY パルスを上記のように組み合わせたものである。右の図はペプチド主鎖上の隣接する 2 つの残基を表し、主鎖 NH 基の 1H 原子は空間的に近接しているので、双極子相互作用を通して、励起状態から緩和するとき 1HN_A 核と 1HN_B 核の間で分極移行が起きる (NOE と標記)。 ^{15}N 核と 1H 核の間の青い矢印は HSQC パルス照射時のコヒーレンス移行を示す。また t_1 , t_2 , t_3 は各スピンのコヒーレンスの展開時間を表す。

最初の HSQC というパルス列によって、 1H 核から ^{15}N 核にコヒーレンス移行させ、 ^{15}N 核を t_1 時間展開し、さらにそれを再び 1H 核にコヒーレンスバックすることによって、 ^{15}N 核の化学シフト周波数 Ω_N で t_1 軸をラベルした NH プロトン (1HN と略記) のコヒーレンスを作ることができる。次の NOESY パルス列で、それを z 磁化にすると、 1HN_A は $^{15}N_A$ 核の化学シフト周波数 Ω_{NA} で振幅変調され、 1HN_B は周波数 Ω_{NB} で振幅変調された z 磁化となる。NOESY の混合期に起きる交差緩和によって z 磁化間の分極移行が起き、 1HN_B の z 磁化にも 1HN_A の z 磁化に比例する成分が交差緩和項として混じってくる (自発緩和の項も存在するので、 1HN_B に比例する項も含む)。すなわち、観測核 1HN_B の z 磁化は、 Ω_{NB} で振幅変調された項と Ω_{NA} で振幅変調された項の和となる。それに続く HSQC パルス列による 1H 核と ^{15}N 核間のコヒーレンス移行と $^{15}N_B$ 核の t_2 時間展開を利用すると、その 1HN_B の z 磁化に、 t_2 軸を Ω_{NB} で周波数ラベルした振幅変調を掛けることができる。最後にそれを 90° 倒して観測核 1HN_B の FID 信号を観測すると Ω_{HB} で振動する t_3 軸上のデータが得られる。

分かりやすくするために、FID 信号の t_1 , t_2 , t_3 時間依存性を模式的に表現しよう (厳密な式ではない)。 t_1 軸のデータは、 Ω_{NA} で振幅変調された項と Ω_{NB} で振幅変調された項の和 $[I_a \cos(\Omega_{NA}t_1) + I_b \cos(\Omega_{NB}t_1)]$ で表される。それに t_2 軸上の振幅変調因子である

$\cos(\Omega_{NB}t_2)$ を掛け、最後に ${}^1\text{HN}_B$ の歳差運動による振動因子 $\cos(\Omega_{HB}t_3)$ を掛けた関数形のデータが時間軸信号として得られる。これをフーリエ変換すると、 ω_1 軸は ${}^{15}\text{N}$ 核の化学シフト Ω_{NB} と Ω_{NA} という位置でピークを示し、 ω_2 軸も ${}^{15}\text{N}$ 核の化学シフト Ω_{NB} のところにピークをもつ。最後に、 ω_3 軸は ${}^1\text{H}$ 核の化学シフトの Ω_{HB} でピークを示す。3次元の $(\omega_1, \omega_2, \omega_3)$ 空間内にこのピークを図示すると図 6-7 のようになる。

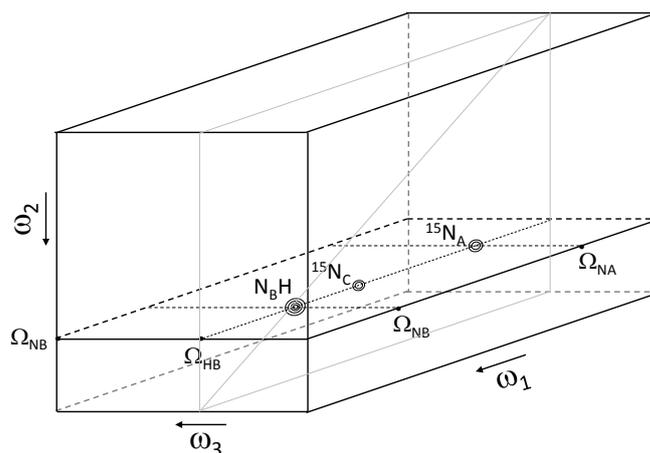


図 6-7 3次元 HSQC-NOESY-HSQC スペクトルの模式図。 ω_1, ω_2 軸は ${}^{15}\text{N}$ 核の周波数、 ω_3 軸は ${}^1\text{H}$ 核の周波数を表す。図 6-6 の例では、 ${}^1\text{HN}_B$ が観測核であったので、 ω_3 軸上では ${}^1\text{H}$ の化学シフト Ω_{HB} 、 ω_2 軸上では ${}^{15}\text{N}$ の化学シフト Ω_{NB} となる交線上にピークが現れる。 ω_1 軸上では、 N_BH 基自身とそれに隣接した N_AH 基の ${}^{15}\text{N}$ 核の化学シフト Ω_{NB} と Ω_{NA} の位置に共鳴ピークが現れる。その結果、図中の N_BH と印した点に N_BH 基自身の対角ピークが強く現れ、 ${}^{15}\text{N}_A$ と印した点に隣接 N_AH 基との交差ピークが現れる。 ${}^{15}\text{N}_C$ は N_BH 基と空間的に近接した NH 基との交差ピークを表す。

分かりやすくするために、FID 信号の t_1, t_2, t_3 時間依存性を模式的に表現しよう (厳密な式ではない)。 t_1 軸のデータは、 Ω_{NA} で振幅変調された項と Ω_{NB} で振幅変調された項の和 $[I_a \cos(\Omega_{NA}t_1) + I_b \cos(\Omega_{NB}t_1)]$ で表される。それに t_2 軸上の振幅変調因子である $\cos(\Omega_{NB}t_2)$ を掛け、最後に ${}^1\text{HN}_B$ の歳差運動による振動因子 $\cos(\Omega_{HB}t_3)$ を掛けた関数形のデータが時間軸信号として得られる。これをフーリエ変換すると、 ω_1 軸は ${}^{15}\text{N}$ 核の化学シフト Ω_{NB} と Ω_{NA} という位置でピークを示し、 ω_2 軸も ${}^{15}\text{N}$ 核の化学シフト Ω_{NB} のところにピークをもつ。最後に、 ω_3 軸は ${}^1\text{H}$ 核の化学シフトの Ω_{HB} でピークを示す。3次元の $(\omega_1, \omega_2, \omega_3)$ 空間内にこのピークを図示すると図 6-7 のようになる。

$\omega_2 = \Omega_{NB}$ における $\omega_1\omega_3$ 平面上の 2次元スライス-スペクトルを取り出すと、 $\omega_3 =$

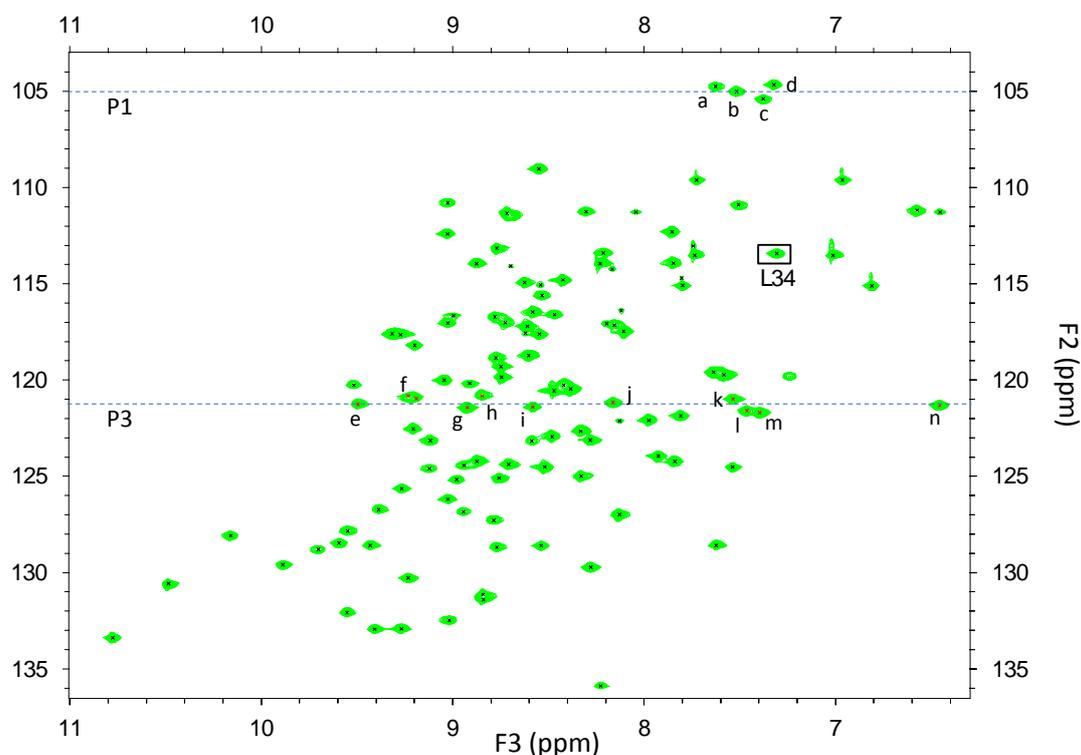
Ω_{HB} の線上に N_BH の他にもいくつかの交差ピークが並ぶ (模式図には $^{15}N_A$ と $^{15}N_C$ の 2 つ)。ピーク ' N_BH ' は観測核 1HN_B 自身の自発緩和による共鳴ピークを表し、 $(\omega_1 = \omega_2 = \Omega_{NB})$ となる対角ピークである。一方、 $^{15}N_A$ や $^{15}N_C$ は、 1HN_B 核に空間的に近接している NH 基の ^{15}N 核の交差ピークである。上記の例では隣接残基を N_AH 基としたので、 $^{15}N_A$ が N_BH 基と隣接 N_AH 基との交差ピーク、 $^{15}N_C$ は、その他の空間的に近接した NH 基との交差ピークを表す。一般には一つに限らず複数個検出される。

3次元のスペクトル空間 $(\omega_1, \omega_2, \omega_3)$ には多数の交差ピークが現れる。これらのピークを2次元平面 $\omega_2\omega_3$ に向かって射影をとると、 ω_1 軸上に展開した複数のピークは平面上の1点に畳み込まれて、この平面上にはタンパク質中の主鎖 NH 基の数だけ交差ピークが現れる。すなわち、この $\omega_2\omega_3$ 平面上に畳み込まれた共鳴ピークは、図 6-2 に示した2次元 HSQC スペクトルと同じものになる。言い換えると、H-N-H パルスプログラムによって得られた3次元スペクトルの共鳴ピークは、2次元 HSQC スペクトル上の NH 基 1 個当たりの交差ピークを ω_1 軸上に引き出して、観測核自身の対角ピークと、それに空間的に近接した NH 基の交差ピークを展開したものである。従って、2次元 HSQC スペクトル上の、ある残基 $B(\Omega_{NB}, \Omega_{HB})$ を取り上げ、それに隣接する残基の ^{15}N 軸上の位置を知ろうと思えば、図 6-7 に示されているように、残基 B の交差ピークから ω_1 軸に沿って引き出した直線上の交差ピークを検出すればよい。すなわち、 $\omega_2 = \Omega_{NB}$ の位置で3次元スペクトルを切り出した $\omega_1\omega_3$ スライス-スペクトルを作成し、 $\omega_3 = \Omega_{HB}$ の直線上のピークを調べると、その中にピーク強度が最も強い残基 B 自身の対角ピーク $(\omega_1 = \omega_2 = \Omega_{NB})$ と、それに隣接する残基との交差ピークが存在している。

2) ピーク帰属の実例：SBD のピーク帰属

図 6-8 は Starch-binding domain of glucoamylase (SBD と略す) という残基数 110 のタンパク質に対して測定された HSQC スペクトルである (正確にいうと、SBD の S-S 結合欠損変異体 C3G/C98G : BMRB Entry ID 11428)。2次元スペクトルなので、縦軸 (^{15}N の化学シフト) を F1 軸、横軸 (1HN の化学シフト) を F2 軸と名付けるのが普通であるが、3次元 NMR スペクトルの共鳴ピークを F2-F3 平面に畳み込んだものが2次元 HSQC スペクトルであると見なすという観点から、縦軸を F2、横軸を F3 と名付けた。各軸の目盛りは ppm 単位で測った化学シフトの値 δ で示す。ピーク帰属を始

めるに当たって、ある種の情報から図 6-8 上の $F2=113.4$ ppm, $F3=7.30$ ppm の位置の交差ピークが L34 という残基であると確定したとして、それを起点としてピーク帰属を始めよう。3次元の H-N-H スペクトルの全ピークを、 $F2$ - $F3$ 平面上に畳み込んだ



6-8 SBD の 2 次元 HSQC スペクトル。ピーク帰属は未定の状態であるが、残基 L34 だけが確定しているとする。縦軸、横軸は $F2$, $F3$ 軸と名付けられている (理由は本文参照)。 $F2$ 軸は ^{15}N 核の化学シフト、 $F3$ 軸は ^1H 核の化学シフトである。 $F2=105$ ppm と 121.3 ppm の位置で $F3$ 軸に平行な直線 : P1, P3 に注目し、その上の交差ピーク a ~ n の中から L34 に隣接する残基を探す。理由は図 6-10 に示した 2 次元スライス-スペクトルにある。

2次元 HSQC スペクトルを想定し、それを $F1$ 軸に沿って引き出したとすると、 $F2=113.4$, $F3=7.30$ の位置から引き出された直線上には残基 L34 自身の対角ピークが、 $F1=113.4$ ppm の位置に存在する。模式的に示したものが図 6-9 である。

実際に測定された SBD の 3 次元 H-N-H スペクトルに対し、Sparky (NMR スペクトルを処理するソフトウェア) を用いて $F2=113.4$ ppm の位置で切り出した $F1$ - $F3$ スライス-スペクトルを作成した。それが図 6-10 である。 $F1$ 軸に平行な直線上には $F1=113.4$, $F3=7.30$ の位置に確かに最も強い共鳴ピークが現れていて、それが L34 自身

の対角ピークである。直線上には、それ以外にもいくつかの交差ピークが存在する。
 $F1=105$ ppm の位置にある比較的強いピークを P1、 $F1=121.3$ ppm のピークを P3 と

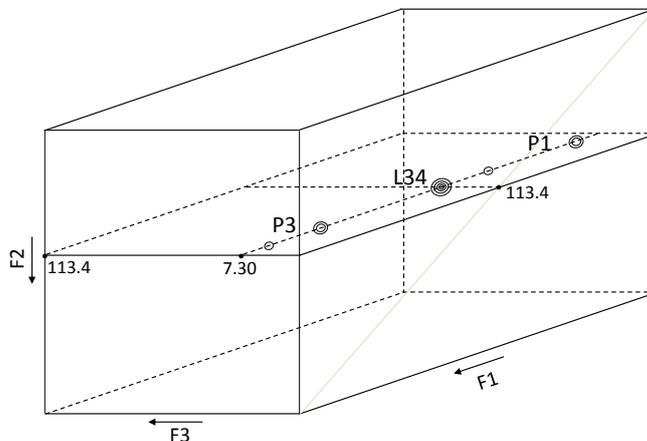


図 6-9 H-N-H の 3 次元スペクトルと $F1$ - $F3$ スライス-スペクトルの模式図。 $F2$ - $F3$ 平面上の $F2=113.4$, $F3=7.30$ の点から、面に直交し $F1$ 軸に沿う直線を引き出すと、いくつかのピークが見つかる。模式図には 5 点のピークが書き込まれているが、その中の主要なピークを P1, L34, P3 と印した。 $F1=113.4$ に位置する L34 は、まさしく図 6-8 に存在する残基 L34 自身の対角ピークである。

名付けた。このピークは L34 に隣接する 2 つの残基の可能性が高い。ピーク P1 の ^{15}N 核の化学シフトは 105 ppm であるが、図 6-8 に示された 2 次元 HSQC スペクトルを見ると、この付近には a, b, c, d という 4 つの残基の交差ピークが存在していて、どれが L34 に隣接する残基なのかは不明である。それを決めるためには $F2=105$ ppm で切り

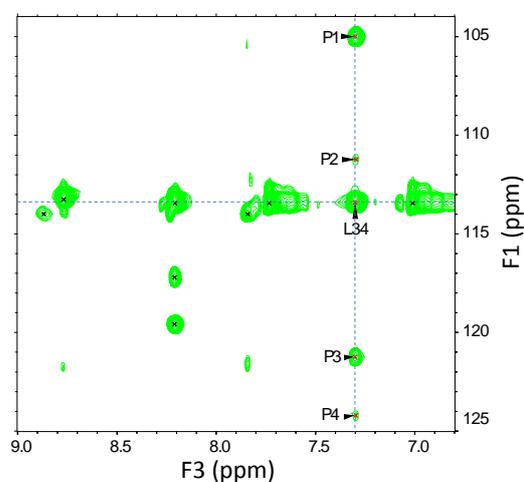


図 6-10 SBD の 3 次元 NMR スペクトルを $F2=113.4$ ppm で切り出した $F1$ - $F3$ スライス-スペクトル。残基 L34 を通って $F1$ 軸に平行に引いた直線上には、L34 以外にも P1, P2, P3, P4 という交差ピークが検出される。図 6-9 に図示した $F1$ - $F3$ 平面上には、このスライス-スペクトルが模式的に描かれている。

出した $F1$ - $F3$ スライス-スペクトルを調べる必要がある。図 6-11 の左図はそれを表して

いる。F1=105 ppm 近傍の横線上には各残基自身の対角ピーク a, b, c, d が確かに並んでいて、F1 軸に平行に下ろした縦線上には、各残基に空間的に近接した交差ピークが並ぶ。しかし、残基 a, c, d に近接する残基には L34 は含まれていない。残基 b だけが、空間的近接ピークとして L34 を含んでいる。従って、残基 b は L34 に隣接する Q33 か G35 の可能性が極めて高い。 ^{15}N 核の化学シフトが 105 ppm と観測範囲の最小値に近いことを考慮するとアミノ酸残基は Gly という可能性が高く、ほぼ G35 であると結論

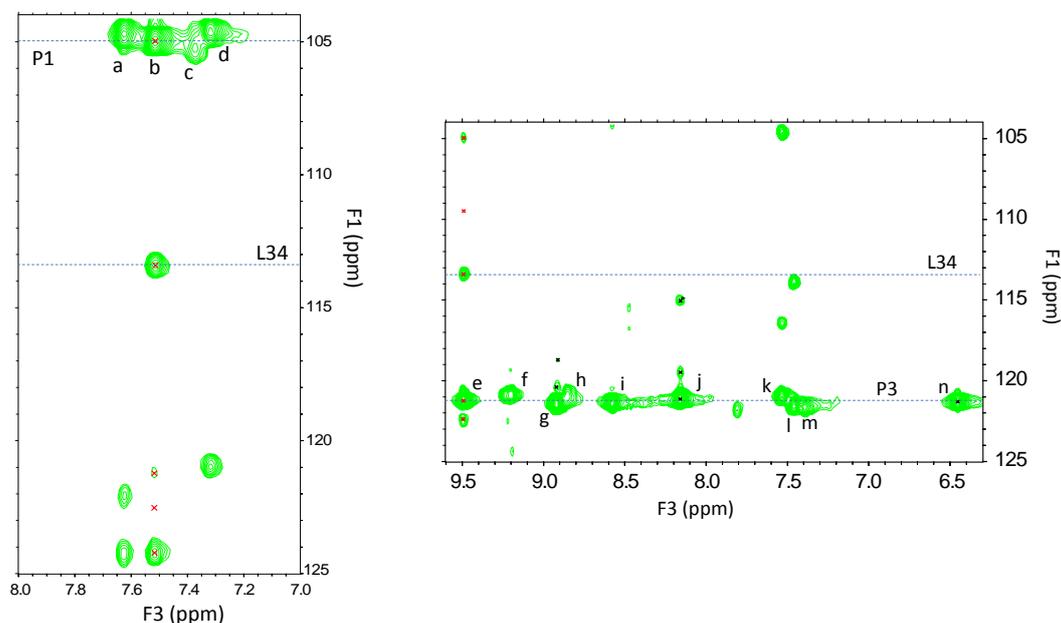


図 6-11 ピーク P1 および P3 の位置における F1-F3 スライススペクトル。左は F2=105 ppm における、右は F2=121.3 ppm におけるスライススペクトル。(左) a, b, c, d が残基自身の対角ピークで、そこから縦に引いた直線上に、当該残基に近接する残基の交差ピークが出現する。L34 の化学シフトの位置に交差ピークをもつ残基は b だけである。(右) e~n が残基自身の対角ピーク。L34 の位置に交差ピークをもつ残基は e だけである。

してよい。残基 b の ^1HN の化学シフトが F3=7.52 であることから、DQF-COSY スペクトルの情報を用いて 7.52 ppm の ^1HN と同一残基内の $^1\text{HC}_\alpha$ の交差ピークを探すと、Gly に特徴的な 2 つの $^1\text{HC}_\alpha$ 核が検出された。ほぼ間違いなく G35 と同定できる。また、ピーク b を含む F1 軸に平行な直線上には、L34 以外にも 3 個の交差ピークが存在する。その中で、F1=124.2 ppm 付近に強いピークが見つかる。このピークが残基 D36 であるという証拠が見つければ、残基 b が G35 という結果が一層確定的になる。ピークがある残基に帰属されたとき、DQF-COSY の情報を併用すると、 ^1HN の化学シフト

から、 $^1\text{HC}_\alpha$, $^1\text{HC}_\beta$, $^1\text{HC}_\gamma$... というように側鎖の ^1H の化学シフトが明らかになって、アミノ酸の種類を限定することに貢献する。実際、 $\text{F1}=124.2 \text{ ppm}$ の残基は D36 として種々の情報が首尾一貫していた。

同様の手続きで、図 6-10 のピーク P3 がどの残基由来のものであるかを調べる。 $\text{F2}=121.3 \text{ ppm}$ の位置で F1-F3 スライス-スペクトルを切り出した。それが図 6-11 の右図である。 121.3 ppm という横線上に存在する $\text{e} \sim \text{n}$ は各残基自身の対角ピークである。そこから縦線を引くと L34 の位置に交差ピークをもつ残基は e だけである。従って、残基 e は G35 か Q33 であるが、残基 b が G35 という結論と矛盾しないためには、残基 e は Q33 となる。その結論をさらに確実にするためには、図 6-11 のピーク e の下に現れている交差ピーク ($\text{F1}=122.5 \text{ ppm}$ 付近) を調べる必要がある。その結果、このピークが残基 S32 であるとする他の DQF-COSY や NOESY スペクトルの情報とも首尾一貫していた。ピーク帰属には絶対的な証拠というものはない。隣接残基間の情報、同一残基内の情報を組み合わせて、首尾一貫した結果となることがピーク帰属の成否の判定条件である。帰属が不適切であれば、すぐに連鎖帰属が途切れてしまう。帰属が成功した残基が長く連続すれば、それだけ帰属の結果の信頼度が上がることになる。 L34 を起点として連鎖帰属を行った結果を、短冊形のスペクトルにして確認してみよう。

図 6-12 は、当該残基を対角ピークとして含む F1-F3 スライス-スペクトルを細い短冊形にして、それを横に並べたものである。例えば、図 6-12 の L34 に対する短冊は、図 6-10 のスライス-スペクトルから残基 L34 を含む部分を細い短冊に切って、 F1 軸を横にして置いたものである。その上の Q33 に対する短冊は図 6-11 の右図からピーク e を含む部分を短冊にしたものである。また、 G35 に対する短冊は、図 6-11 の左図からピーク b を含む部分を短冊に切り取ったものを L34 の短冊の下に置いたものである。このように、連続する残基の短冊を並べると、隣接する残基間の交差ピークの位置がぴったり一致して並ぶ。また、 Q33 と G35 は隣接してないが、両残基間の交差ピークが明瞭に現れていて、ピーク帰属の結果を一層確実に証明している。 D36 と L34 の間の交差ピークに関しても同じことが指摘できる。

残基 L34 を起点として連鎖帰属を行った結果、 I31 から G42 まで連続 12 残基の帰属が成功した。これは相当幸運な例である。ときどき連鎖帰属が途切れながらも帰属できた部分を増やしていくと、やがて全残基に対して矛盾のないアミノ酸残基の同定が成功

していく。詳細には述べなかったが、DQF-COSY に現れる残基内の ^1H 間交差ピークのパターンにはアミノ酸残基特有の明確な特徴があって、連鎖帰属から同定された

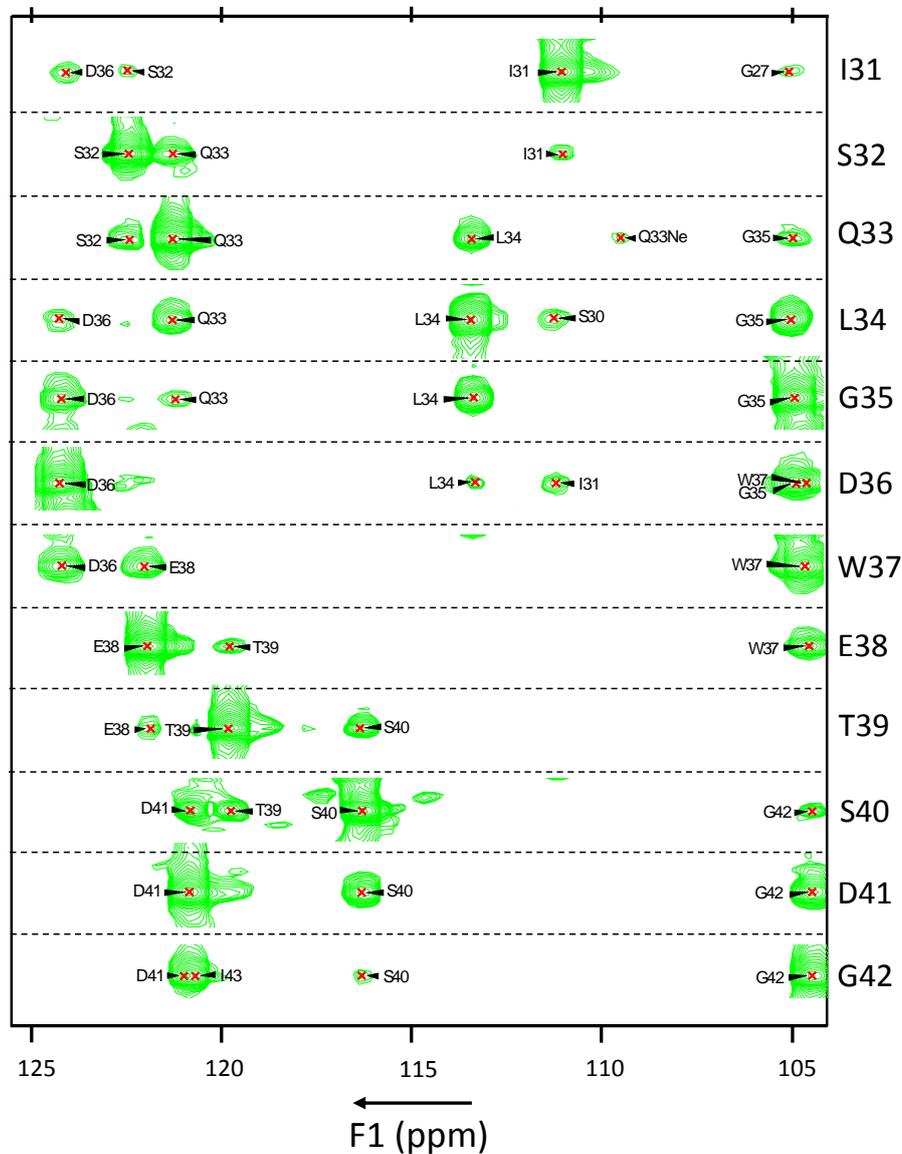


図 6-12 F1-F3 スライス-スペクトルを短冊形にして並べたもの。切り出した縦型の短冊を時計回りに 90° 回転して並べてある。短冊の右端には当該残基名が表示されている。

アミノ酸残基の DQF-COSY 情報がアミノ酸固有の情報と矛盾しないかどうかは重要な判定条件である（例えば Gly 残基には $^1\text{HN}-^1\text{HC}_\alpha$ の交差ピークが 2 個存在）。以上が SBD というタンパク質に対して行われたピーク帰属の一部分である。

具体例として取り上げたリゾチームと **SBD** の **NMR** スペクトルは下記の参考文献を参照していただきたい。また、第3章の図3-2で取り上げた **HSQC** スペクトルは208残基から成る **PCP** というタンパク質のものである（下記参考文献5）。

参考文献：

1. Y. Noda et al. *Biochemistry* **41** (2002), 2130-2139. “NMR Structural Study of Two-Disulfide Variant of Hen Lysozyme: 2SS[6-127,30-115] - A Disulfide Intermediate with a Partly Unfolded Structure”.
2. A. Yokota et al. *Biochemistry* **43** (2004), 6663-6669. “NMR Characterization of Three-Disulfide Variants of Lysozyme, C64A/C80A, C76A/C94A, and C30A/C115A - A Marginally Stable State in Folded Proteins”.
3. H. Sugimoto et al. *J. Mol. Biol.* **412** (2011), 304-315. “NMR Analysis of a Kinetically Trapped Intermediate of a Disulfide-Deficient Mutant of the Starch-Binding Domain of Glucoamylase”.
4. S. Segawa 関西学院大学リポジトリ A007008 研究資料 (2015) “Experimental Evidence for the Structure of Lysozyme in the Transition State of Folding”.
5. S. Iimura et al. *Biochemistry* **46** (2007), 3664-3672. “Characterization of the Denatured Structure of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile under Nondenaturing Conditions: Role of the C-terminal α -Helix of the Protein in Folding and Stability”.

第7章 NMR 分光法でリゾチームの遷移状態の構造を探る

§17 リゾチームの遷移状態を原子レベルの分解能で解析する

1) 秩序構造を部分的に失ったリゾチーム変異体の作製

タンパク質の折りたたみ反応を知るためには、その反応速度の解析から遷移状態に関する情報を得ることが重要だと述べてきた。リゾチームの遷移状態は天然状態の構造に近く、タンパク質の内部秩序構造は融解しているが大きな構造変化はなく、タンパク質内部への水の浸入はほとんど起きていない (Dry Molten Globule)。リゾチームの SS 結合欠損変異体の folding-unfolding 反応速度からは、その遷移状態において SS4 結合 (Cys76-Cys94) 近傍の構造は天然立体構造に近く緊密に折りたたまれているが、SS3 結合 (Cys64-Cys80)、SS2 結合 (Cys30-Cys115)、SS1 結合 (Cys6-Cys127) の近傍は融解した構造であることが判明した。しかし、これは SS 結合欠損による反応速度定数 k_f や k_{uf} への影響を考慮して間接的に得られた情報である。SS 結合欠損の影響をもっと直接的に調べる方法はないだろうか。それが、NMR 分光法による SS 結合欠損変異体の構造研究である。リゾチームには上記の 4 本の SS 結合が存在するが、その SS 結合を順次欠損させていくと、天然秩序構造が徐々に失われていく。1 本の SS 結合を欠損した 4 種類の 3SS 変異体は、欠損した SS 結合の位置に応じて、天然構造の秩序度が部分的に失われて融解したような状態になるが、どの変異体も立体構造をまだ安定に保っている。一方、3 本の SS 結合を失った 4 種類の 1SS 変異体は、すべて天然の立体構造を失った無秩序鎖の状態になる (無秩序度に相違は存在するが)。2SS 体はその境界線上にあって、残存する SS 結合の位置に応じて、分子全体の秩序構造がかりうじて保持されたものから、全体が無秩序鎖になったものまで分布する。遷移状態とは折りたたみ反応経路上の N 状態と U 状態の分岐点に対応していた。すなわち、このような SS 結合欠損変異体の残留秩序構造を探る研究は、リゾチームの「折りたたみ反応の遷移状態」を平衡状態にある分子の構造から詳細に研究する手段を与えてくれるのである。

2) リゾチームの短距離 NOE 相関と 2 次構造分布

リゾチームの SS 結合欠損変異体の構造を考察する前に、その比較標準構造として、

リゾチーム 4SS 体の NMR 構造解析を行なった (リゾチーム 4SS 体とは大腸菌を用いて発現させた天然型リゾチームである。そのため、N 末端に Met 残基が付加して残っている分、天然リゾチームとは少し異なる)。天然リゾチームの分子構造はすでに X 線結晶構造解析によって詳細に解明されている。一方、HSQC、DQF-COSY、NOESY、さらに 3D-HSQC-NOESY-HSQC スペクトルを測定し、その交差ピークから水溶液中のリゾチーム分子の約 660 個のプロトンの共鳴周波数を同定した。NMR 情報から得られるリゾチームの立体構造を解析し、それを X 線構造解析の結果と比較して考察してみよう。

(i) リゾチーム 4SS 体の短距離 NOE チャート

図 7-1 はリゾチーム 4SS 体の各残基に対して検出された短距離 NOE 相関を表している。短距離とはアミノ酸配列上 5 残基以内の距離にある残基を指す。NN(i,i+1)は隣接

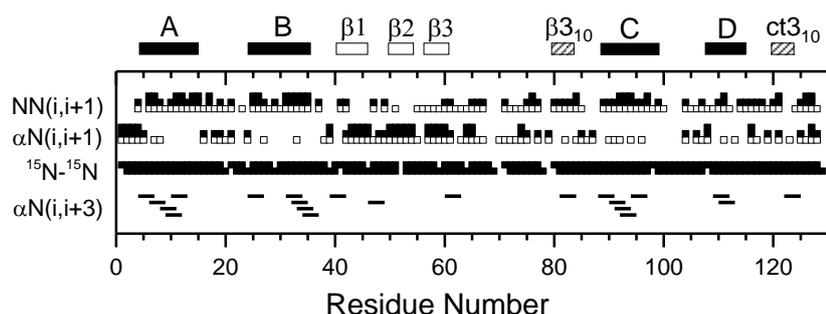


図 7-1 リゾチーム 4SS 体に対して観測された短距離 NOE チャート。図上部の横棒は、黒が α ヘリックス、白が β ストランド、斜線が 3_{10} ヘリックスの部分を表す。NN(i,i+1)、 α N(i,i+1)、 ^{15}N - ^{15}N 、 α N(i,i+3) などの記号の意味は本文参照。

残基の NH プロトン間に検出される NOE 相関 (d_{NN} 相関) である。□は弱い NOE 交差ピークが観測されることを意味し、その上に■がのっているものは NOE 相関が適度に強く、2つあるものは十分強いことを意味している。 α N(i,i+1)は i 番目の残基の C_αH と (i+1)番目の残基の NH というプロトン間の NOE 相関 ($d_{\alpha\text{N}}$ 相関) である。 ^{15}N - ^{15}N は 3D-HSQC-NOESY-HSQC で検出された隣接残基の ^{15}N 核間の交差ピークを表す。最後の、 α N(i,i+3)の欄の横棒は、残基 i の C_αH と残基(i+3)の NH プロトン間に NOE 相関が検出されたことを表している。主鎖が α ヘリックス構造をとると隣接残基の NH プロトンの距離が近くなり、 β ストランドになると主鎖の C_αH と次残基の NH が近接するという構

造上の特徴があるため、 d_{NN} 相関が強く観測される領域は α ヘリックスとなる可能性が高く、 $d_{\alpha N}$ 相関が強く現れる領域は β ストランドとなる確率が高い。X 線構造解析の結果と図 7-1 に示された d_{NN} 、 $d_{\alpha N}$ が強く現れる領域を比較すると良い相関関係が存在していることが分かる。NMR の短距離 NOE 相関からタンパク質の 2 次構造分布を予測する方法の信頼度は十分高いと言える。さらに、 $\alpha N(i,i+3)$ 相関は連続する 5 個の 2 面角が α ヘリックスを指定するとき現れる NOE 相関なので、それが連続して現れる領域は、安定な α ヘリックス構造をとっていると考えてよい。事実、A、B、C ヘリックスには $\alpha N(i,i+3)$ 相関が連続した領域が明瞭に存在している。 ^{15}N - ^{15}N 相関がほぼ全ての残基間に存在するという事実は、NH 基を起点とするピーク帰属がほぼ全残基にわたって成功していることを保証している。

(ii) リゾチーム 3SS 変異体の 2 次構造の安定性

リゾチーム 3SS 体の短距離 NOE 相関を図 7-2 に示す。(a)は SS2 結合欠損体、(b)は

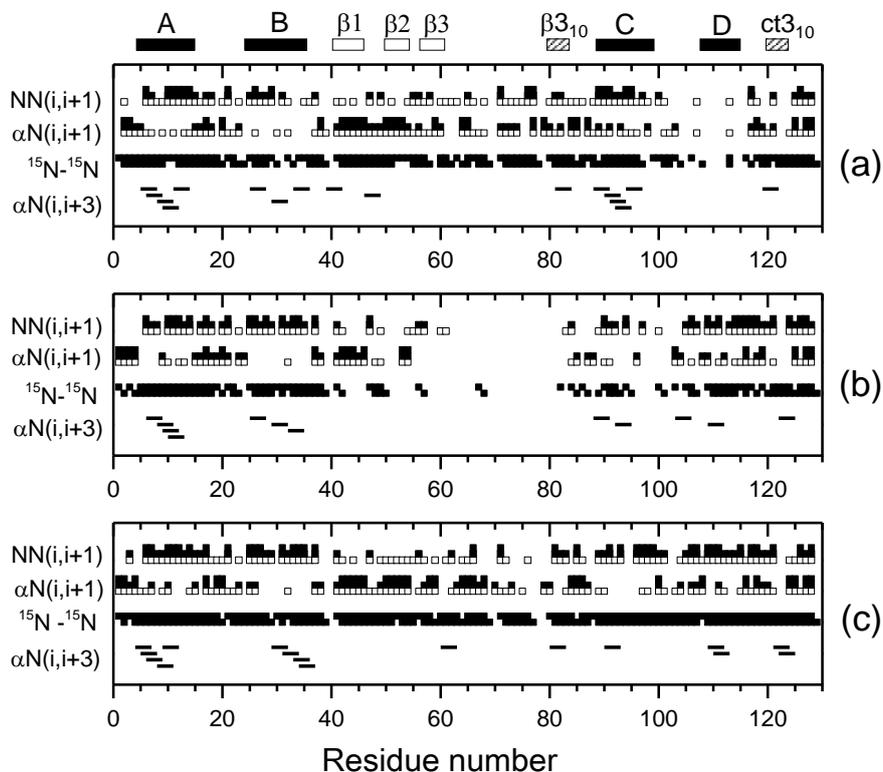


図 7-2 リゾチーム 3SS 変異体の短距離 NOE 相関。図の記号は図 7-1 と同じ。(a) SS2 結合欠損体、(b) SS3 結合欠損体、(c) SS4 結合欠損体。

SS3 結合欠損体、(c)は SS4 結合欠損体のデータを表している。化学修飾によって作製された SS1 結合欠損体はその詳細な X 線構造解析の結果が発表されているので、NMR 測定は行っていない。SS1 結合欠損体は C 末端の数残基の構造に僅かな変化があるだけで、その立体構造はほとんど天然 4SS 体と同じであることが分かっている。

SS4 結合欠損体(c)の特徴から始めよう。NN(i,i+1)相関も α N(i,i+1)相関も、ほとんど 4SS 体と変わらず強く現れている。4SS 体との違いは、C ヘリックス内の α N(i,i+3)相関が消えている点である。C ヘリックス中心部の Cys94 が Ala に置換されたことによって連続する 4 残基先までの規則性を少し損なっているが、NN(i,i+1)は十分強く存在しているので、 α ヘリックス構造が崩壊しているわけではない。A、B、D ヘリックスも、 β 1、 β 2、 β 3 ストランドから成る β シート構造もほぼ完全に保持されている。それに反して、SS3 結合欠損体(b)は残基 57-80 の領域で短距離 NOE 相関がほぼ完全に失われている。3D-HSQC-NOESY-HSQC スペクトル上の ^{15}N - ^{15}N 相関まで消失している。ここは β 3 ストランドからループ構造を含む領域で、SS3 結合 (cys64-Cys80) を失うとリゾチーム分子の β ドメイン (残基 40-87) の秩序構造が大きく損なわれることが分かる。SS 結合欠損体の NMR 構造解析が明らかになるまで、SS4 結合と SS3 結合の役割の違いは全く想像できなかった。しかし、SS3 結合欠損体の A、B ヘリックス、さらに D ヘリックスから C 末端にかけての構造に特に大きな変化はなく、 α ドメイン (残基 1-39 と 88-129) の立体構造は安定に保持されていることが分かる。SS2 結合欠損体(a)の構造は D ヘリックスの無秩序化が進んだことを除いて大きな変化はない。A ヘリックスも β ドメインの構造も安定に維持されている。B ヘリックスは α N(i,i+3)相関が失われているが NN(i,i+1)相関は残っているのでヘリックス構造は維持されているが、D ヘリックスが崩壊していることは確かである。しかし、その影響は D ヘリックス領域に限定されていて C ヘリックスは安定に保持されており、C 末端の構造も特に大きな変化はない。結局、3SS 変異体は全て 3 次元の立体構造を安定に維持していると言えることが出来る。

3) リゾチームの遠距離 NOE 接触マップ

NOESY スペクトル上で検出される交差ピークの内、残基間距離が 5 残基以上離れたものを遠距離 NOE 接触と名付けた。例えば、図 6-5 に示した 2D-NOESY スペクトルには、配列上は遠く離れたアミノ酸の側鎖間に沢山の NOE 交差ピークが観測される。

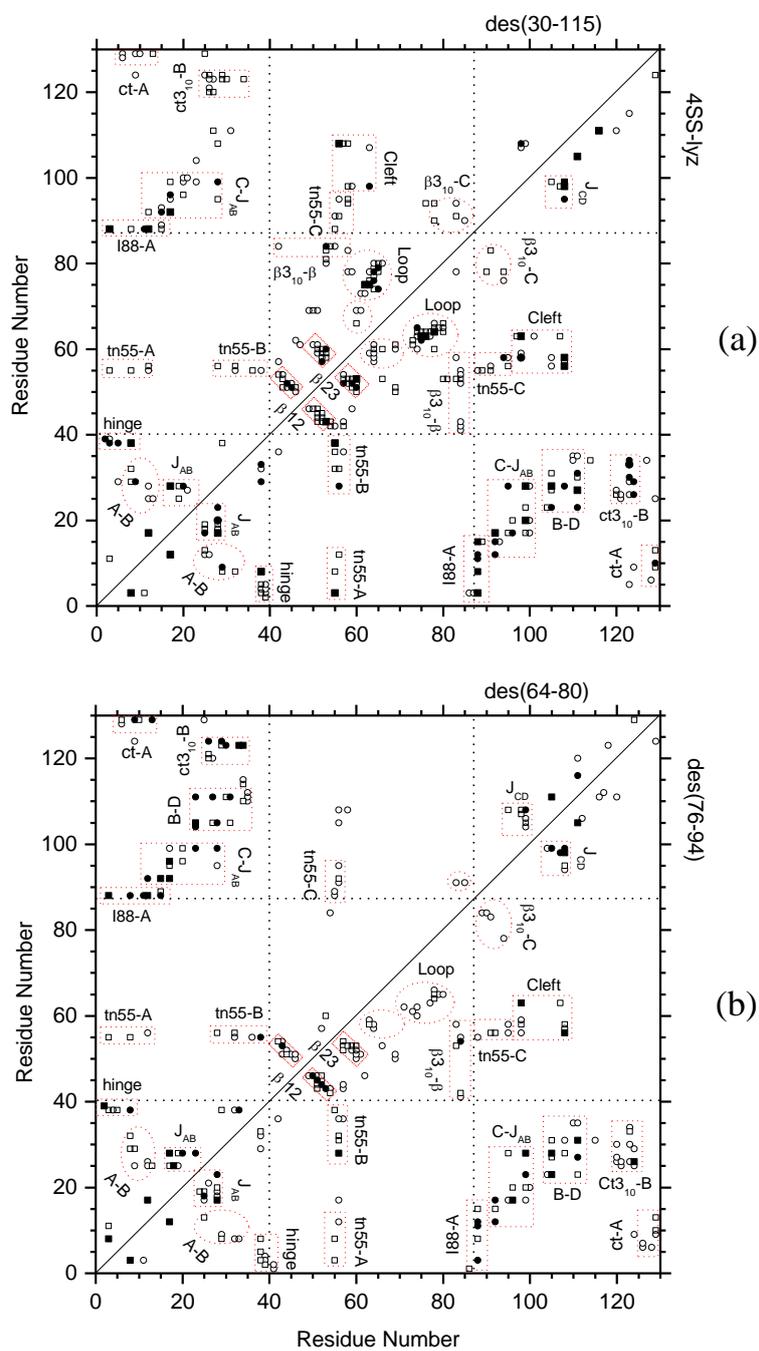


図 7-3 リゾチームに対して観測された遠距離 NOE 接触マップ。残基対内で検出された交差ピークの数に応じて記号は区別して描かれている。○(ピーク数 1)、□(2-3)、●(4-5)、■(6 以上)。図中の B-D や C-J_{AB} などの記号の意味は本文参照。図(a)は 4SS 体と SS2 結合欠損体の遠距離接触マップ、図(b)は SS4 結合欠損体と SS3 結合欠損体の遠距離接触マップを比較したもの。

それを丹念に拾って図 7-3 のように、2 次元の座標軸上の交点として表示したものが遠距離 NOE 接触マップである。遠距離接触する残基対には一般に NOE 接触をする複数のプロトン対が存在する。例えば、残基 i と残基 j の NOE 交差ピークの場合、残基 i の主鎖上の NH や C α H プロトンと残基 j の側鎖上のプロトン間の接触、あるいは双方の側鎖上のプロトン間の NOE 接触も存在する。沢山の交差ピークが検出される残基対は接触度が大きいと判断されるので、交差ピークの数に応じて接触マップ上の記号は区別して描かれている (図 7-3 の脚注参照)。図 7-3(a)は上が SS2 結合欠損体の遠距離接触マップを表し、下が 4SS 体のマップである。遠距離接触の残基対は対角線に対して対称に分布しているので、比較してどこが変化しているか分かりやすい。最初に、天然型の 4SS 体リゾチームにおける遠距離 NOE 接触の特徴について述べよう。

(i) 4SS 体リゾチームの遠距離 NOE 接触マップ

図 7-3(a)の対角線より下半分のマップに注目する。リゾチームの α ドメインの N 端側半分 (残基 1-39) において、NOE 接触を表すスポットが集まった領域が存在し、J_{AB}, A-B, hinge と名付けられている (図 7-3a 参照)。以下の説明を理解するために図 2-2 を参照するとよい。J_{AB} は A ヘリックスと B ヘリックスの連結部で M12-L17, L17-L25, D18-L25, N19-L25, L17-W28, Y20-W28 などが NOE 接触している残基対である。A-B は A ヘリックスと B ヘリックスの接触部で、L8-V29, L8-A32, A9-V29 が NOE 接触する残基対である。さらに、hinge と呼ぶ部分は、N 端側 α ドメインの両端が近接している部位で、V2-N39, F3-N39, F3-F38, R5-F38, L8-F38 などが NOE 接触している残基対である。この領域を hinge と呼ぶ理由は残基 38-40 の部分が α ドメイン (残基 1-39 と 88-129) と β メイン (残基 40-87) の間の蝶番の一部だからである。一方、 α ドメインの C 端側半分 (残基 88-129) には J_{CD} と名付けられた領域があり、C, D ヘリックスの連結部で I98-A107, I98-W108, V99-M105, V99-W108 が NOE 接触している残基対である。

α ドメインの N 端側半分と C 端側半分の界面には沢山の遠距離 NOE 接触が見出される。B-D, ct₃₁₀-B, ct-A, C-J_{AB}, I88-A などである。B-D は B ヘリックスと D ヘリックスの接触面を表し、N27-W111, A31-W111, E35-A110, W28-M105, Y23-M105, W28-W108 が接触残基対である。ct₃₁₀-B は C 末端付近の 3₁₀ ヘリックス (残基 120-124) と B ヘリックスの接触部、ct-A は C 末端と A ヘリックス接触部である。この領域で特に重要な遠

距離相互作用は C-J_{AB} と I88-A である。I88, V92, K96, V99 は C ヘリックスの片面に並んで側鎖が α ドメインの中心部に向かっている残基である。I88 は A ヘリックス上の L8, M12 と NOE 接触し、V92, K96, V99 は A, B ヘリックスの連結部 J_{AB} に存在する M12, H15, L17, Y20, W28 と NOE 接触している。 α ドメインの中心部には疎水性残基が多く存在し、C-J_{AB}, I88-A や B-D という NOE 接触領域は「疎水性コア」と呼ばれている。この領域は α ドメイン (1-39 と 88-129) の立体構造を安定に維持するために特に重要な役割を果たしている。

一方、 β ドメイン (残基 40-87) 内にも重要な NOE 接触領域が存在し、図 7-3 では β 12, β 23, Loop, β 3₁₀- β と名付けられている。 β 12, β 23 とは反平行の β 1- β 2 ストランドと β 2- β 3 ストランドで、対角線に直交する特徴的な線上に NOE 接触残基が並んでいる。Loop とは残基(62-79)の領域に含まれる残基間の NOE 接触を表していて、主鎖は不規則構造であるが沢山の遠距離相互作用が観測される。さらに、 β 3₁₀- β は β 3₁₀ ヘリックス(残基 80-84)と β シート上の残基 51~53 との間の NOE 接触を表している。一方、 α と β ドメイン間の遠距離相互作用に関しては、 β 2, β 3 ストランド間のヘアピンターンに存在する I55 と L56 という 2 つの疎水性残基が極めて重要な役割を果たしている。図 7-3 上では tn55-A, tn55-B, tn55-C と記された部位で、I55 と L56 (tn55 と略称) は、その疎水性側鎖を α ドメイン内に形成された A, B, C ヘリックスの「疎水性ポケット」に深く埋没させて β ドメインを α ドメインに繋ぎ止めるアンカー (錨) の役割を果たしている (図 2-2 では側鎖が赤色で表示)。我々はこの部分をリゾチーム分子の立体構造における「ピボット (要)」と呼んでいる。他にも β ドメインと α ドメインの C 端側には、図 7-3 に示された Cleft と β 3₁₀-C という領域が存在する。Cleft はリゾチームの基質分子結合部位に対応する部分であり、 β 3₁₀-C は β 3₁₀ ヘリックスと C ヘリックスの接触部位で、I78-(A90, C94)とか L83-S91 が NOE 接触している残基対である。 β 3₁₀ ヘリックスは、 β -シートとの遠距離相互作用を通して β ドメイン全体の構造安定性に寄与し、また、C ヘリックスとの遠距離 NOE 接触を通して残基 87 付近で 2 つのヘリックスが屈曲する構造をとっている。その結果 Cys76 と Cys94 が近接し、リゾチームの構造形成にとって重要な役割を果たしている。残基 86~88 のターン部分は残基 38~40 の部分と共に、 α - β ドメイン間の hinge に対応し、tn55 の部分と共にリゾチームのピボットを形成している。

天然リゾチーム分子の立体構造は X 線結晶構造解析によって十分詳しく知られて

いるが、NMR 分光法の遠距離 NOE 相互作用マップという実験データによっても再確認された。しかし、それは「当たり前」の事実ではなく、水溶液中でもタンパク質分子は結晶中と同じ構造を維持しているということである。水溶液中では分子構造は大きく揺らぎ、また、アミノ酸置換によって秩序構造を失う部分も存在する。分子はどの部分でどの程度の構造変化がおきているのだろう、それを知る手がかりは NMR 分光法による遠距離 NOE 接触情報しかないのである。それをこれから考察してみよう。

(ii) 3SS 変異体の立体構造：構造の一部が融解している

図 7-3(b)の対角線より下に示された 3SS 変異体 des(76-94)の遠距離 NOE マップを 4SS 体のもものと比較しよう。NOE 接触を表すスポットの色の濃さが des(76-94)では幾分薄いだけで、違いはほとんど見られない。特に、Cys76-Cys94 が欠損した部位に近い Loop や β_{310} - β という領域においても NOE 接触が失われていない。つまり des(76-94)という 3SS 変異体の立体構造は、ほとんどどこも失われていないのである。

しかし、図 7-3(b)の上半分に示された des(64-80)という 3SS 変異体の NOE 接触マップを下半分の des(76-94)のものとは比較してみよう。 β ドメイン内の NOE 接触マップに大きな違いがある事がすぐ分かる。 β_{12} という領域は残っているが、 β_{23} 、Loop、 β_{310} - β という領域の NOE 接触は全く失われている。X 線構造解析による天然リゾチームの立体構造からは分からなかったが、Cys64-Cys80 という SS 結合は Cys76-Cys94 に比べて β ドメインの立体構造安定性に大きな役割を果たしているのである。何故だろう。Cys64-Cys80 が β_3 ストランドから Loop 領域にかけての構造を安定に保ち、それが β_{310} - β や cleft (β_3 と C ヘリックス間) という構造を維持するのに寄与していると想像される。 β_{310} という小さなヘリックス構造が β ドメインの構造安定化に大きな役割を果たしていることが分かる。Cleft や β_{310} -C という領域の NOE 接触が失われているのもそのせいであろう。一方、des(64-80)という 3SS 変異体において、 β_{12} という NOE 接触が維持されていることは注目に値する。また、C-J_{AB} と I88-A という遠距離 NOE 接触が明瞭に残っていることも見逃せない。これは C ヘリックスの片側に並ぶ疎水性残基を A, B ヘリックスに向けて配置し、疎水性ポケットを形成している証拠である。 β_{12} という反平行の β ストランド構造の端に位置する tn55 (I55, L56)をこのポケットに繋ぎ止めて、立体構造がほとんど失われた β ドメインを α ドメインに繋ぎとめている。それが des(64-80)と

いう 3SS 変異体の際立った特徴である。

次に、des(30-115)という 3SS 変異体の立体構造を見てみよう。図 7-3(a)に対角線を挟んで 4SS-lyz の遠距離 NOE マップとの比較が示されている。マップはほとんど対称的であるが、“B-D”という領域だけが明確に欠けている。Cys30-Cys115 という SS 結合の欠損によって D ヘリックスの構造だけが融解したからである、なぜなら、J_{AB} や A-B という領域の NOE 接触は明確に保存されていて B ヘリックス自身は安定に保持されている。また、des(6-127)変異体の立体構造も C 末端だけの僅かな構造変化に限られている。つまり、SS 結合 1 本の欠損による立体構造変化はその直近だけに限られているが、des(64-80) 3SS 変異体の場合だけは例外的にその影響が大きかったのである。

4) リゾチーム分子の立体構造の動的揺らぎを観測する

水溶液中の天然リゾチーム分子やその 3SS 変異体の立体構造は NMR スペクトルの遠距離 NOE 接触マップを調べることによって知ることが出来た。しかし、水溶液中のタンパク質の立体構造は、その平均構造の周りで動的に揺らいでいる。それをどのようにして観測できるかという問題を考察しよう。

(i) タンパク質主鎖 NH プロトンの H/D 交換反応速度

重水中に溶解されたタンパク質の主鎖 NH 基のプロトンの H/D 交換反応は高分解能の NMR 分光法によって残基毎の分解能で容易に測定することが出来る。水素-重水素交換が起きれば、NH プロトンの NMR の信号が消滅し、HSQC スペクトルの交差ピークの強度が減少するので、その反応速度を観測する。タンパク質立体構造は局所的にしばしば揺らぎ、埋もれていた NH 基が溶媒の重水中に露出すると、NH 基の水素結合の相手が D₂O に置換して H/D 交換反応が起きる。従って、NH 基の H/D 交換反応を阻止する因子は、一般に NH 基の分子内水素結合と、それが分子内に埋没して溶媒分子との接触が阻止されていることである。H/D 交換反応は、pH*=3.8 (pH*とは D₂O 溶液の pD を pH 電極で読み取ったままの値) 25°C という条件下で測定された。溶媒に完全に露出したペプチド鎖の状態にあるアミノ酸残基の固有の H/D 交換反応速度は、その前残基も考慮に入れて半経験的に k_{int} として決めることが出来る。実際にタンパク質中に存在するアミノ酸の NH 基の H/D 交換速度 k_{prot} を測定し、PF=k_{int} / k_{prot} をタンパク質中

に埋もれた NH 基の H/D 交換反応速度の PF 因子(protection factor)と定義する。図 7-4 はリゾチームの 3SS 変異体や 4SS-lyz の個々のアミノ酸残基に対して測定された H/D 交換反応の PF 値を示している。PF 値は立体構造の揺らぎによって NH 基が溶媒に露出する頻度を示す指標として用いることが出来る。タンパク質表面にあるアミノ酸の場合、PF 値は 1~10 程度であるが、立体構造に深く埋没したアミノ酸残基の場合は、タンパク質全体の構造が U 状態になるまで溶媒に露出しないので、PF 値はアンフォールディング反応の平衡定数 K_{uf} の逆数にほぼ等しくなる。一方、立体構造の表面近くに埋もれて

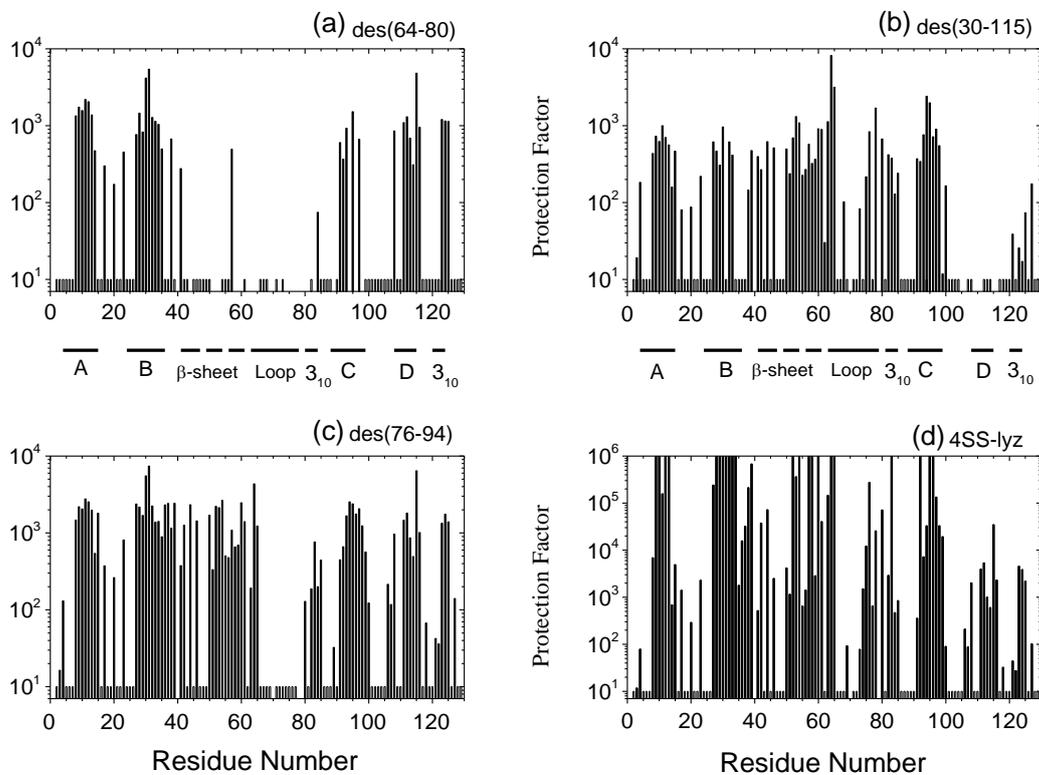


図 7-4 リゾチーム 3SS 変異体の個々のアミノ酸残基に対する PF 値。(a) des(64-80), (b) des(30-115), (c) des(76-94), (d) 4SS-lyz。H/D 交換反応は、全て $pH^*=3.8$, $25^\circ C$ で測定された。短い縦棒 (PF=10) で示された残基の交差ピークは、 H_2O 中では観測されるが D_2O 中ではすでに反応が終了して観測されない。観測された PF の値の意味に関しては本文参照。参考のために、アミノ酸配列に沿ってリゾチームの 2 次構造分布が示されている。

いるアミノ酸の場合、局所構造の揺らぎによって NH 基が露出状態と埋没状態を繰り返す、 $1/PF$ は露出状態にある滞在時間の割合を表している。熱測定の実験から得られた

リゾチームの 4SS 体や 3SS 変異体の K_{uf} の値は、 8.6×10^{-8} (4SS-lyz), 4.3×10^{-4} (des(76-94)), 2.3×10^{-3} (des(64-80)), 2.7×10^{-3} (des(30-115)) であった。3SS 変異体の場合は、最も大きな PF 値は 10^3 前後の値を示し、4SS 体の場合は 10^6 を超える値を示している。図中に示されたリゾチームの 2 次構造を参照すると、A,B,C ヘリックスや β シートの中央部がリゾチーム立体構造の最も安定な部分であり、分子全体の立体構造が崩壊するまでアミノ酸残基は分子内部に埋もれていることが分かる。

(ii) SS 結合欠損によって立体構造の揺らぎはどのような変化を受けるか

SS 結合が 1 本でも欠損するとタンパク質の立体構造は著しく不安定になる。それは 4SS 体と 3SS 体の K_{uf} の値を比べれば容易に理解できる。しかし、立体構造を維持している限り、その表面近くの局所秩序構造の揺らぎはどのような変化を受けているのだろうか。4SS-lyz と des(76-94) の PF 値を比較して考察しよう。4SS 体の A, B, C ヘリックスや β シートの中央部に存在する残基の PF 値は 10^6 を超えていて非常に安定である。この部分が溶媒に露出するのは確かにタンパク質全体が U 状態になるときだけである。しかし、その「コア構造」領域の周辺部や D ヘリックス、あるいは 2 つの 3_{10} ヘリックス領域の PF 値は $10^3 \sim 10^4$ 程度で、3SS 体の PF 値と同程度である。つまり des(76-94) 変異体においては、分子全体の立体構造が不安定になったため PF= 10^6 を越える「コア構造」の PF 値が D ヘリックスや 3_{10} ヘリックス領域の PF 値にまで低下したのであって、立体構造の核の周辺部に存在するアミノ酸の PF 値は SS 結合欠損の影響をほとんど受けていない。タンパク質立体構造の安定性が減少して「コア領域」が溶媒に露出する頻度は増大したが、立体構造を形成したタンパク質の表面近くの局所秩序構造の揺らぎは特に増大していない。des(30-115) 変異体の構造の揺らぎを見ても、D ヘリックスや $ct3_{10}$ ヘリックス以外の領域の PF 値は des(76-94) と同程度に維持されている。分子全体の立体構造が形成されている限りは、SS 結合欠損部位直近を除くと、局所秩序構造の揺らぎは大きな影響を受けない。この事実は des(64-80) 3SS 変異体の立体構造の揺らぎに対しても成りたっている。この 3SS 体の場合、 β ドメイン全体の PF 値が消滅していて、この領域の構造の揺らぎは顕著に増大しているが、分子全体の構造は維持されていて、A, B, C, D や $ct3_{10}$ ヘリックスという α ドメイン内の局所秩序構造の PF 値は des(76-94) 3SS 変異体の場合と同程度に保たれている。この立体構造の描像は、遠距離 NOE マップから得

られた立体構造の特性と首尾一貫している。SS 結合の欠損は、その直近の領域を除くと、立体構造の局所部分構造の揺らぎには大きな影響を与えないと結論できる。しかし、その局所秩序構造が失われたとき、4本のSS結合の内1本が失われたことの影響は著しく大きくなり、4SS体に比べ「コア構造」の安定性が顕著に減少するのである。

5) 折りたたみ反応の遷移状態の構造の詳細

リゾチームの折りたたみ反応の遷移状態に関する情報は、4種の3SS変異体の速度定数： k_f と k_{uf} を測定し、特定のSS結合欠損による速度定数への影響を考察して遷移状態の様子を探った。Cys76-Cys94 (SS4結合)の欠損は k_{uf} の増大幅が最も小さく、 k_f が最も遅くなる(つまり最も壊れにくく巻き戻りにくい)ことから、遷移状態の自由エネルギーは最も高く、SS4結合近傍の構造が天然状態に近くなるまで回復しないと遷移状態を通過できないことが分かった。対照的な存在はdes(64-80)変異体である。 k_{uf} が著しく増大し、 k_f は4SS体とほぼ変わらない。 β ドメインが大きく秩序構造を失っていても、Cys76-Cys94が存在していれば折りたたみ反応の遷移状態を超えて立体構造を回復することが出来る。つまり、立体構造形成のためにはCys76とCys94が近接して β_{310} ヘリックスからCヘリックスにかけてのピボット領域の構造回復が遷移状態を通過するための必要条件であると考えられる。4SS体のタンパク質の折りたたみ反応が起きる場合でも、SS3結合の近傍(β 3ストランドからループ構造の領域)は、遷移状態において秩序構造が大きく失われていても構わないことを示唆している。

変異体リゾチームの立体構造の揺らぎに関する観測データは、この知見と首尾一貫しているだろうか。SS4結合欠損体の場合、遷移状態を通過するまで、立体構造はSS4結合近傍の局所構造を含めて天然状態同様に保持されているのでNからU状態への遷移は容易ではない。一方、SS3結合欠損体の場合は、立体構造を維持している状態でも β ドメインはほぼその全体が秩序構造を失っていて、あと一步で立体構造全体が失われる状態にあり、逆に、その一步の回復によって遷移状態は立体構造を取り戻す。SS3結合欠損体の立体構造保持の最後の砦は、Cヘリックスの片面を α ドメイン中心部に配向して形成される疎水性ポケットにtn55 (I55, L56)の部分を繋ぎ止めているピボット構造である。I55, L56が α ドメイン内のA, B, Cヘリックスが作るポケットから抜け出してしまうとピボット構造が失われ、 α ドメインの構造安定性までも失うだろう。一方、SS4結合欠損体の折りたたみ反応においては、Cys76とCys94を近接させる β_{310} ヘリックス

から C ヘリックスにかけてのターン領域の構造回復に時間がかかって反応速度が大きく減少するのであろう。これがリゾチームの立体構造変化の遷移状態の描像である。

一方、遷移状態における α ドメインの構造はどのようなであろうか。3SS 体である des(30-115)と des(6-127)の遠距離 NOE マップや H/D 交換反応に対する PF の情報から考察すると、遷移状態では、D ヘリックスや ct3₁₀ヘリックスは秩序構造を失っているが、B ヘリックスや A ヘリックス、さらに C ヘリックスと A, B ヘリックス間の疎水性相互作用は緊密に折りたたまれていて α ドメインの構造は安定に保たれている。これがリゾチーム分子の立体構造を保つ必要最小限の条件で、それが担保されている限り立体構造は保持されている。この事実は、さらにもう 1 本の SS 結合を欠損させた 2SS 変異体の構造を調べることによってさらに明確になった。

6) リゾチーム 2SS 変異体は秩序-無秩序構造の分岐点

(i) 2SS[6-127, 30-115]変異体だけがかろうじて立体構造を維持している

Cys6-Cys127 と Cys30-Cys115 の 2 本の SS 結合を保っている 2SS[6-127, 30-115] 変異体以外は、 α ドメインに高々 1 本の SS 結合を残すだけである。そのため、 α ドメインの秩序構造を維持することが出来ない。既に述べたように、A, B, C という 3 本のヘリックスによって α ドメイン内に形成された疎水性ポケットが確保できないと β ドメインのピボットを α ドメインに繋ぎ止めておくことが出来ない。分子全体の立体構造を維持するためには致命的な欠陥である。事実、2SS[6-127, 30-115]変異体以外の 3 種の 2SS 変異体はどれも分子全体が無秩序構造のままである（例えば、後述の図 7-7(d)に示した near-UV CD スペクトルは、水溶液中で 2SS[6-127, 64-80]が立体構造を失った状態であることを示している）。

図 7-5 は 2SS[6-127,30-15]変異体と 3SS 変異体 des(64-80)の遠距離 NOE マップを比較したものである。2SS 変異体においても、 α ドメインの N 端側半分と C 端側半分の NOE 接触部位がほぼ完全に保存されている。注目に値するのは、C-J_{AB} や I88-A という遠距離 NOE 接触が存在するという事実である。また、2SS 体の β ドメインは大きく秩序構造を失っているが、 β 12 という遠距離 NOE の存在は逆平行 β ターン構造の保持を意味し、tn55-B という遠距離 NOE は、逆平行 β ターン構造の端が α ドメイン内の疎水性ポケットに固定されていることを示している。この部分はリゾチーム立体構造のピボ

ットと名付けたが、そのピボット構造が 2SS 体においても観測されている。それは 2SS[6-127,30-115]にも立体構造がろうじて維持されている証拠である。それ以外の 2SS 変異体においては、2 本の SS 結合が残っていても、分子全体が無秩序構造になっている理由は、それらの 2SS 体では、 β ドメインのピボット構造を α ドメインに安定に繋ぎ止めておくことが出来ないからである。

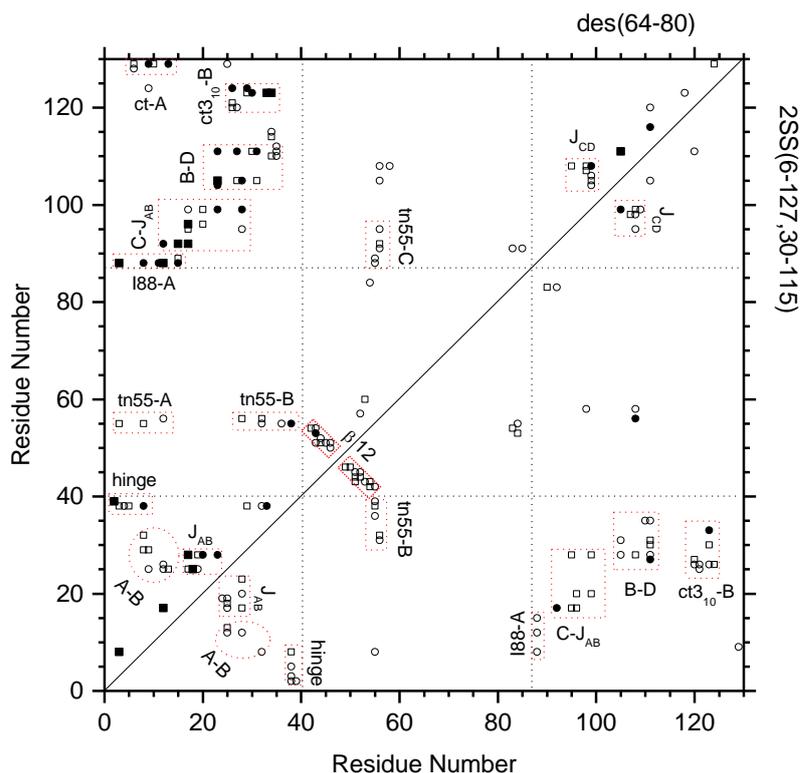


図 7-5 2SS[6-127,30-115]と SS3 結合欠損体(des64-80)の遠距離 NOE 接触マップ。点の色の濃さは多少薄いものの 2SS 変異体のマップは対角線に対してほぼ対称的に表れていて、des(64-80)変異体とほぼ同じ立体構造を維持していることが分かる。

図 7-6 は 2SS[6-127,30-115]と SS3 結合欠損体 des(64-80)の H/D 交換反応に対する PF 値の分布を表している。この場合も 2SS 変異体と 3SS 変異体の立体構造の違いは、遠距離 NOE マップを比較して検討した結果と同様である。すなわち、2SS 変異体の構造安定性は 3SS 体に比べ 1/10 程度に減少しているが、H/D 交換反応に対して α ドメインは保護されていて、立体構造が維持されていることを示している。それに反して、 β ドメインの方は、どちらの変異体においても容易に H/D 交換反応が起き、無秩序鎖の状

態である事を示している。注目に値するのは、2SS[6-127,30-115]変異体の残基 54-57 の領域に PF 値が残っている点である。この事は、前述のように、 α ドメインと β ドメインの接触部であるピボット構造が安定に維持されている証拠である。

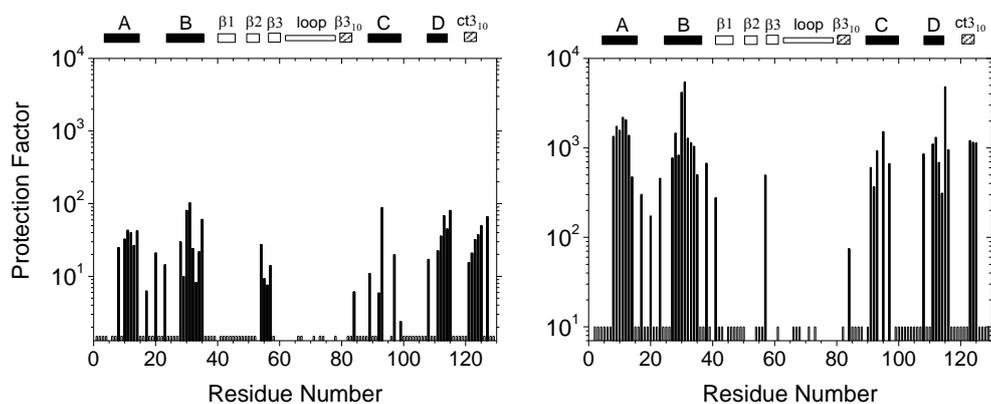


図 7-6 2SS[6-127,30-115]のリゾチームに対して観測された H/D 交換反応の PF 値。左：2SS[6-127,30-115]、右：SS3 結合欠損体 des(64-80)の PF 値。2SS 体の PF の値自身は 3SS 体の 1/10 程度であるが、PF 値が大きい部分の分布はほぼ同じである。特に 2SS 変異体においても、残基 55,56 付近の PF 値が大きいことが注目に値する。

(ii) Cys76 と Cys94 は介在するペプチド鎖固有の構造的特性で近接する

遠距離 NOE マップから見ても、SS4 結合欠損体 des(76-94)と 4SS 体の立体構造はほぼ同じであった。また、図 7-5 が示していたように、2SS[6-127,30-115]と SS3 結合欠損体 des(64-80)の遠距離 NOE マップもほぼ同じであった。つまり、SS4 結合：Cys76-Cys94 は、その存在の有無に関わらず、リゾチームの立体構造維持には大きな影響がない。つまり、Cys76 と Cys94 の間に介在する、 β_{310} ヘリックスや残基 87 近傍のターン構造を経て C ヘリックスに至るまでの空間配置は、介在するアミノ酸配列が強く記憶している構造的特性だと言えることができる。SS4 結合がなくてもこの空間配置を維持できるのである。リゾチームの折りたたみ反応において、この部分の構造形成は大きな役割を果たしている。既に述べたように、残基 55,56 近傍はリゾチームの α と β ドメインの接合部で、ピボットと称してきた。 β_{310} ヘリックスから C ヘリックスにかけての残基 87 付近のターン構造も、 β と α ドメインの接合部に当たり、ピボットの一部である。 β ドメインのピボットが α ドメインの疎水性ポケットに安定に繋ぎ止められた構造が現れ

るとリゾチームの立体構造は、折りたたみ反応の遷移状態を乗り越えていくのだろう。

(iii) 立体構造が崩壊する寸前の立体構造は 2SS[6-127, 30-115]変異体である

リゾチームの SS 結合欠損変異体を用いて、その立体構造を NMR 分光法によって調べ、立体構造が崩壊する寸前の詳細な構造を考察してきた。β ドメインはループ領域を含む大部分が大きく秩序構造を失っていても分子全体の立体構造は維持されている。しかし、それは安定な α ドメインの構造が存在していることが前提条件である。α ドメインの C 末端側の D ヘリックスや ct3₁₀ ヘリックスが秩序構造を失っても大きな問題ではないが、α ドメインのコア領域にまでそれが及ぶようになれば大問題である。β ドメインの構造が大きく揺らいでいても、β1-β2 鎖の反平行ヘアピン構造 (D48 でターンする残基 40-55 の部分) は容易には失われない。また、β3₁₀ ヘリックスから C ヘリックスの部分も残基 86-88 のあたりでターンして Cys76 と Cys94 を近接させる傾向が強いので、それが C ヘリックスを A, B ヘリックスに近接させ、疎水性ポケットを形成し、I55, L56 という残基の側鎖を α ドメイン内のその疎水性ポケットに沈めて、大きく揺らぐ β ドメインを α ドメインに繋ぎ止める「錨」の役割を果たしている。この部分をリゾチーム分子の立体構造のピボットと呼んだが、分子表面に存在する部分的秩序構造の無秩序化がたまたま重なって、このピボットにおける α, β ドメイン間の錨が一旦外れるとリゾチームのアンフォールディング反応が開始し、分子全体が無秩序鎖状態に向かって不可逆に変化し、元に戻る事が極めて困難な U 状態にまで到達するのである。

7) 高濃度グリセロールは無秩序鎖のリゾチーム変異体に部分構造を誘導する

(i) 2SS[6-127, 64-80]はグリセロール添加によって立体構造を再生する

水溶液中では、2SS[6-127, 30-115]以外の 2SS 変異体はすべて立体構造を維持できなかった。もちろん全ての 1SS 変異体も無秩序鎖のままである。しかし、グリセロールを含む溶液中で far-UV, near-UV CD スペクトルを測定すると、明瞭な秩序構造の回復が観測された。図 7-7 は様々な 2SS 変異体、1SS 変異体を用いて、その CD スペクトルのグリセロール濃度依存性を観測した結果である。ポリペプチド鎖のヘリックス含量の指標である 220nm 近傍の CD スペクトルの楕円率は、図 (a), (b) が示すように、1SS[64-80]

も 2SS[6-127, 64-80]もグリセロール濃度の増大とともにヘリックス含量が顕著に増加する。2SS 体の場合は、0%グリセロールでもすでにヘリックス含量が増大しているが、それがタンパク質内のどの部分で増加しているのかは明らかでない。むしろ、グリセロール添加によって増大するヘリックス含量はペプチド鎖上の特定部位に存在する持続的なヘリックスでないことを暗示している。後述の H/D 交換反応の PF に関する実験データからも、10%グリセロール中の 2SS[6-127, 64-80]には、H/D 交換から保護された特定部位はどこにも存在していない (図 7-9 参照)。一方、図(c)は 50%グリセロール中の

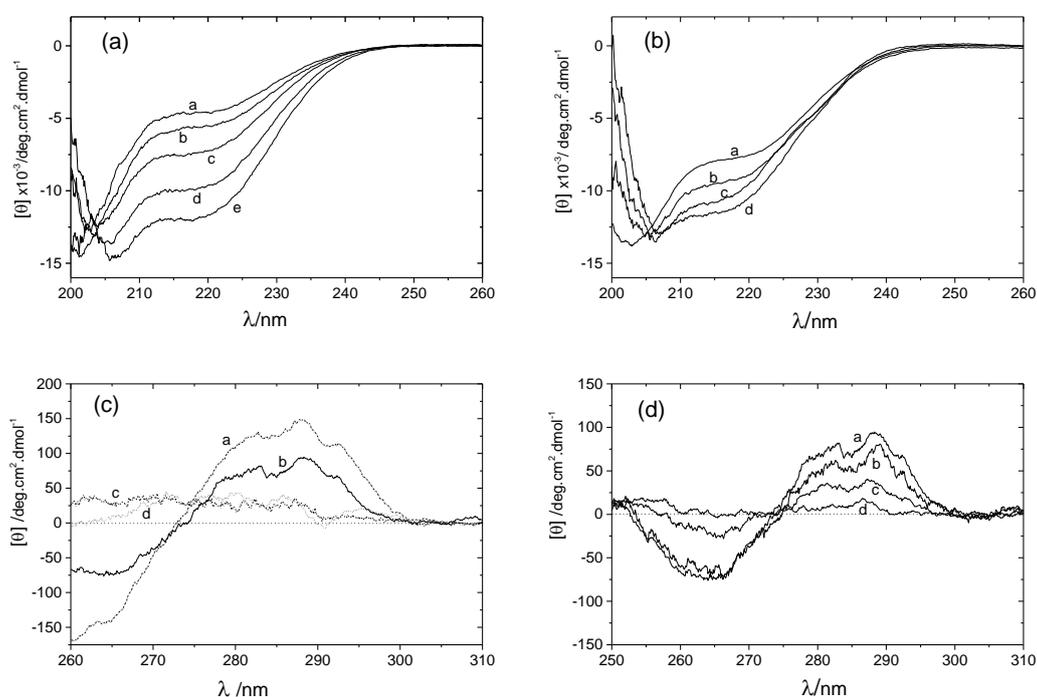


図 7-7 (a) 1SS[64-80]の far-UV CD スペクトル、グリセロール濃度 a:0%, b:10%, c:30%, d:50%, e:70%。(b) 2SS[6-127, 64-80]の far-UV CD スペクトル、グリセロール濃度 a:0%, b:10%, c:30%, d:70%。(c) 2SS、1SS 変異体の near-UV CD スペクトル in 50% glycerol、b:2SS[6-127, 64-80]、c:2SS[64-80, 76-94]、d:1SS[64-80]、a:wild-type。(d) 2SS[6-127, 64-80]の near-UV CD スペクトル、glycerol 濃度依存性 a:50%、b:30%、c:10%、d:0%。

near-UV CD スペクトルで、2SS[64-80, 76-94]や 1SS[64-80]の立体構造は無秩序のままであるが、2SS[6-127,64-80]のスペクトルは天然のものに近いことを示している。図(d)はその立体構造再生の度合いがグリセロール濃度の増加に伴って増大することを示して

いる。CD スペクトルの情報だけでは、タンパク質のどの領域の立体構造が回復したのかは特定できない。NMR スペクトルの距離情報が必要になるが、残念なことに、高濃度のグリセロール溶液中では、NMR 共鳴線の広幅化のため十分な解像度をもつスペクトルを得ることが不可能であった。すなわち、ピーク帰属が出来ないため、近距離も遠距離も NOE 情報が得られなかった。

そのため、高濃度グリセロール溶液中で H/D 交換反応を実行し、その反応速度から保護された部分のアミノ酸残基を同定して 3 次構造を形成した領域を探る方法を採用した。分解能のよい NMR スペクトルを得るためには一旦グリセロールを取り除き、その後、NMR スペクトルを測定するが、その間に HD 交換反応が進行してしまつては意味がない。95%DMSO/5%D₂O は最適の溶媒であった。この溶媒中では H/D 交換反応は通常の H₂O 中に比べ約 100 倍遅く、2 次元 HSQC スペクトルを測定する程度の時間では H/D 交換反応は実質的に進行しない。図 7-8 はピーク帰属をするために 95%DMSO/5%H₂O 中で測定された HSQC スペクトルである。この溶媒中ではタンパク質は完全

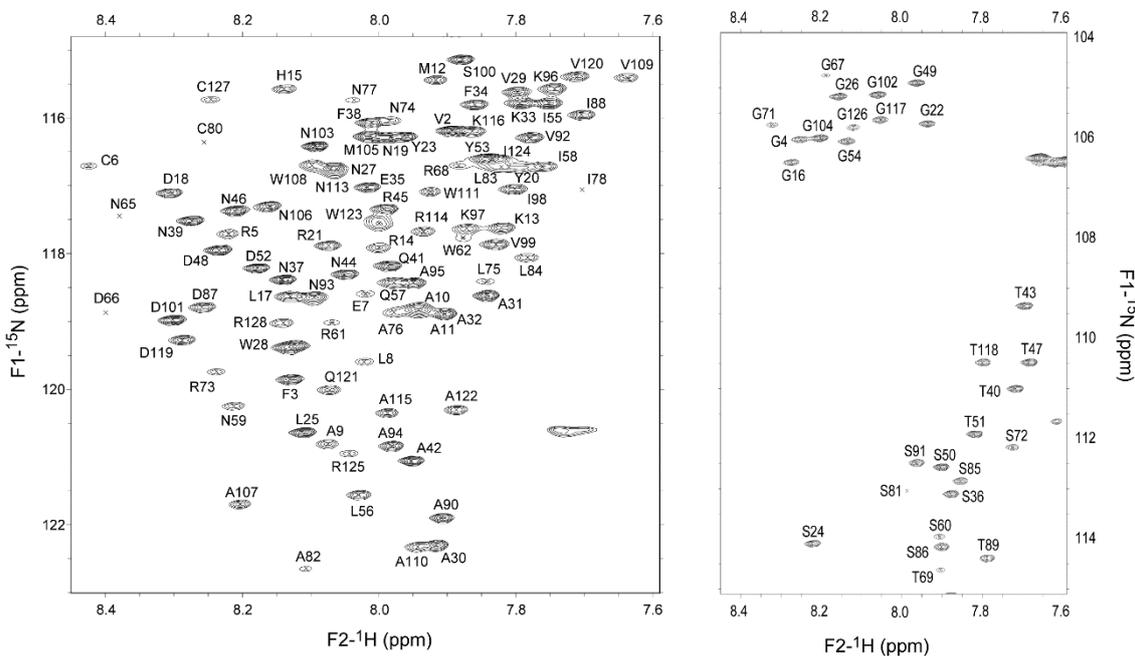


図 7-8 95%DMSO/5%H₂O 溶媒中で測定された 2SS[6-127, 64-80]の HSQC スペクトル。右は F1 軸に沿って上半分、左はその下半分を表している。この溶媒中で測定された HSQC-NOESY-HSQC スペクトルに基づいてピーク帰属が行われた。残留する SS 結合近傍の数残基の交差ピークは広幅化のため強度が弱い。帰属された化学シフト値は BMRB11052 に登録されている。

にランダムコイル状態なので、共鳴線は鋭いが化学シフト値の分散範囲は狭い。それでも交差ピークは十分な分解能で得られた。H/D 交換反応後、重水素化されずに残留した NH ピークは 95% DMSO / 5% D₂O 中で測定され、そのピーク体積の時間変化（指数関数的減少曲線）から H/D 交換反応の時定数が計算された。

(ii) グリセロール溶液中で残基毎の H/D 交換反応の PF 値を測定する

グリセロールを含む溶液中と、蟻酸緩衝液中で測定された H/D 交換反応の時定数を用いて、H/D 交換反応の PF 値をアミノ酸残基毎に求めた。すなわち、 $PF = \tau_{\text{glyc}} / \tau_{\text{for}}$ である（図 7-9 参照）。 τ_{glyc} 、 τ_{for} はそれぞれ、グリセロール溶液中、蟻酸バッファー中で測定された H/D 交換反応の時定数である。グリセロールが 10% 程度の濃度のときは、ペプチド主鎖全体にわたって PF 値が一様に 10 程度である。H/D 交換反応が強くプロテクトされた特定の領域が存在しなくて、その領域は流動的である。20% グリセロール濃度になると、3 次構造が形成された領域が明瞭になって、D ヘリックスや loop 領域は

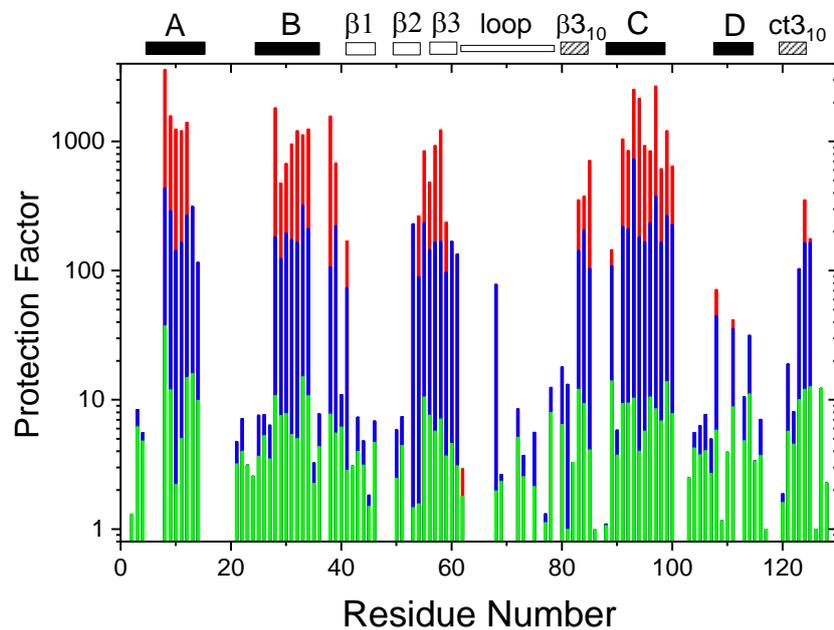


図 7-9 2SS[6-127, 64-80]の H/D 交換反応に対する残基毎の PF 値。グリセロール濃度：(緑) 10% (青) 20%、(赤) 30%。

3 次構造を形成していない。30% グリセロールになると、その特徴はさらに明確になり、

A, B, C ヘリックス、 $\beta 2$, $\beta 3$ ストランド、 $\beta 3_{10}$ ヘリックスが強くプロテクトされた領域として検出される。この事実は、水溶液中では無秩序鎖であったものが、高濃度グリセロール中で天然リゾチームに近い立体構造を回復したことを示唆している。

(iii) 選択的水和構造による 2SS[6-127, 64-80]の立体構造の再生

一般に、グリセロールはタンパク質の折たたまった構造を選択的水和 (preferential hydration) によって安定化することが知られている。すなわち、グリセロールのような大きな溶媒分子はタンパク質表面から排除される傾向がつよく、タンパク質の水和層に水分子が集中することによって、タンパク質の疎水性相互作用を強化する役割を果たす。リゾチームの 2SS[6-127, 64-80]は α ドメインの構造安定性が不十分なため α , β ドメイン間のピボット構造を失って無秩序鎖状態になっている。30%程度のグリセロール濃度になると、選択的水和構造によってピボット部分の疎水性コアが安定性を回復してタンパク質全体の立体構造が再生したものと考えられる。一方、2SS[64-80, 76-94]の場合は 50%グリセロール溶液中でも特定領域の 3 次構造は全く回復していない。それは α ドメインの SS 結合を 2 本とも失っているため、選択的水和構造の手助けだけでは正しい立体構造にたどり着けないからであろう。以上の知見から、2SS[6-127, 64-80]変異体はリゾチームが天然立体構造を形成する寸前の構造を反映していると言える。すなわち、2SS[6-127, 64-80]はリゾチーム折りたたみ反応の遷移状態に対応していると考えることが出来る。すでに指摘した通り、2SS[6-127, 30-115]はアンフォールディング反応の遷移状態を示唆しており、これらの 2SS 変異体がリゾチーム折り畳み反応の遷移状態の前後の状態を表していると言うことができるだろう。

(iv) 4 本の SS 結合の内、Cys6-Cys127 は特別に重要な意味を持っているのか

水溶液中では、1SS 変異体はどれも無秩序鎖の状態であった。高濃度のグリセロール中で CD スペクトルを測定しても、ヘリックス含量の回復は見られるものの、その構造はペプチド鎖上の特定部位に形成される持続的なヘリックス構造ではなかった。Near-UV スペクトルは 50%, 70%グリセロール溶液中でも無秩序鎖の状態であったが、1SS[6-127]だけは、265 nm 付近に負の楕円率の顕著なスペクトルが現れる。それが何を意味するのかを明らかにするために、4 種の 1SS 変異体に対しても、高濃度のグリセロ

ール中で H/D 交換反応を実施し残基毎にその PF 値の測定を行った。方法は 2SS[6-127, 64-80]に対して行ったものと全く同じである。残留する SS 結合近傍の数残基に対して

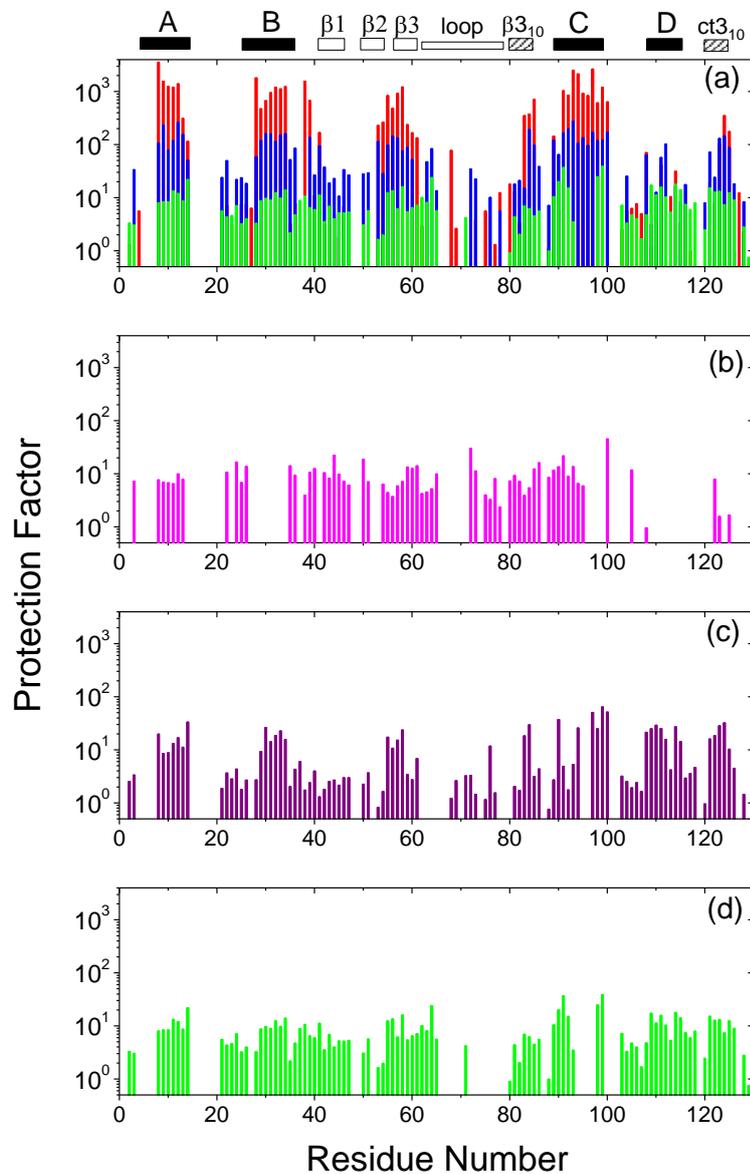


図 7-10 高濃度グリセロール中で行った 1SS 変異体の H/D 交換反応の結果。アミノ酸残基に沿ってその PF 値がプロットされている。(a) 青：1SS[6-127] in 50% glycerol、比較のために赤：2SS[6-127, 64-80] in 30% glycerol と緑：図(d)と同じものが表示されている。(b) 1SS[30-115] in 50% glycerol。(c) 1SS[64-80] in 70% glycerol。(d) 1SS[76-94] in 70% glycerol。

は、ピークの広幅化によって PF 値のデータが不確定であるが、1SS[6-127]以外の 1SS 体

の場合、どのアミノ酸残基に対しても一様に PF 値は 10 程度で、プロテクトされた特別な領域は存在しない。しかし、1SS[6-127]の場合だけは、50%グリセロール存在下で PF 値が 100 程度に増大し（青の棒線部）、その領域はアミノ酸残基上の特定部位に限定されている。すなわち、30%グリセロール中の 2SS[6-127, 64-80]において PF 値が大きかった領域（赤い棒線）と一致している。値自身は小さいがその領域が限定されている事実は、1SS[6-127]上の特定部位が持続的に構造を維持し H/D 交換反応からプロテクトされていることを示唆している。その領域が A, B, C ヘリックスと $\beta 2$, $\beta 3$ ストランド、 $\beta 3_{10}$ ヘリックス領域である事は、Cys6-Cys127 結合がリゾチーム分子の立体構造の枠組みを決定し、選択的水和構造が、弱いながらも、 α ドメインの構造形成を促進しているのだろう。それが、2SS 変異体の立体構造を部分的に再生する場合でも、常に Cys6-Cys127 間の SS 結合を必要とした理由である。

Supplement: TMV の試験管内再構成実験

生物は生体高分子を構成部品とする巨大分子構築物である。ウイルスは自己複製に必要な最小限の物質を備えているが、構成部品を生成する能力は宿主細胞に頼らざるを得ない生物と無生物の境界の物質である。ウイルスの構成部品（タンパク質と核酸）を精製して試験管内に共存させると、それは自発的に組織化してウイルスの形態を形成する。試験管内で形態形成が起きることは、その反応が構成分子だけで起きる物理現象であることを証明している。分子構築物としての生物の形態形成過程を知ろうと思えば、ウイルスは最もシンプルな研究系である。タバコモザイクウイルス (TMV) を例として、その形態形成の過程を分子レベルで詳細に観察してみよう。

以下の図や写真などは、P.J.G. Butler & A. Klug が著わした「タバコモザイクウイルスの形態形成」という解説（日経サイエンス：1979年1月号）に掲載されたものである。

1) タバコモザイクウイルスの形態形成

電子顕微鏡で撮られた TMV の結晶構造は図 S-1 に示されている。外径 40 nm、内径 18 nm、長さ 300 nm の棒状構造で構成分子もよく分かっている。遺伝子として 1 本鎖 RNA を中心部に含み、その周りを 2130 個のコートタンパク質が RNA 鎖を囲んでいる（コートタンパク質モノマーの分子量は 17,604）。1 本鎖 RNA は 6395 塩基長で、コートタンパク質の遺伝子のほかに、3 種のタンパク質の遺伝子をコードしていて、その

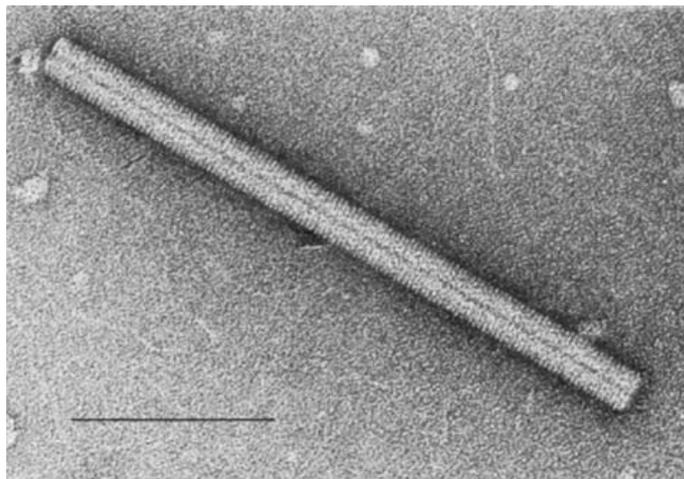


図 S-1 TMV の電子顕微鏡像。外径 40 nm、内径 18 nm、長さ 300 nm の円筒状の形態。中央の黒い部分は 1 本鎖 RNA の存在を表し、タンパク質粒子がそれをコートしている。

うち2つは自己の RNA 複製酵素に関与している。1 個のコートタンパク質モノマーに対して RNA の 3 塩基が対応して結合している。

1955 年、H. Fraenkel-Conrat と R. Williams は、TMV の 1 本鎖 RNA からコートタンパク質を剥がしてそのモノマー粒子を一旦バラバラに分解し、それぞれの構成分子を精製した後、再びそれらを試験管内で混合するというウィルスの再構成実験を行った。その結果、感染性のある天然のウィルスが再生した。この実験は、感染性という生物機能そのものが核酸やタンパク質という巨大分子の物理・化学的な分子構築物に宿っていることを証明している。

(i) TMV コートタンパク質の会合体 (A. Klug らの実験)

R. Franklin の下で X 線構造解析による TMV の研究を行った A. Klug は、その後、電子顕微鏡による TMV の形態形成の研究を始めた。最初、彼は TMV のコートタンパク質だけの系に起きる構造形成反応を調べた。図 S-2 はタンパク質会合体の電子顕微鏡

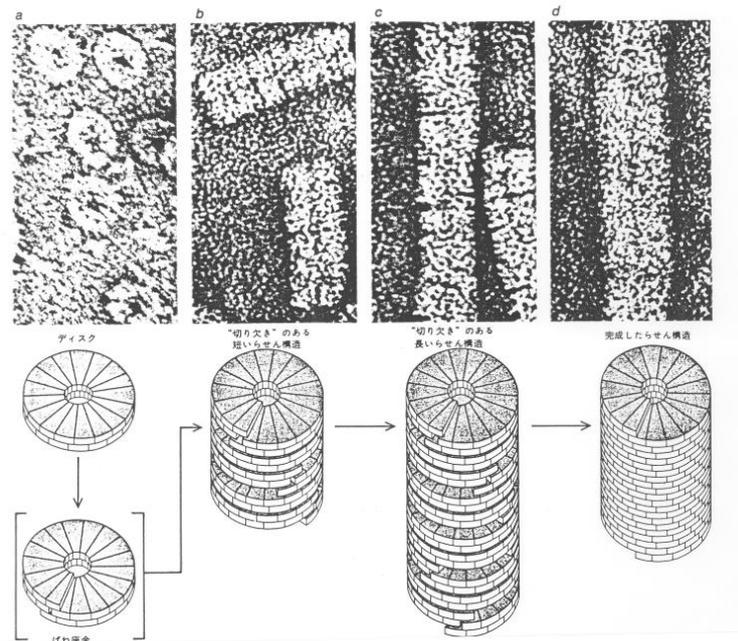


図 S-2 TMV コートタンパク質だけの構造形成反応。上段は電子顕微鏡写真、下段はその模式図。a は 20S ディスクの構造。b, c はそれがスプリングワッシャー状に変化してスタックしたもの。d はそれが TMV 様の棒状構造に重合して完成したタンパク質会合体。

写真である。図中の a は 20S ディスクと呼ばれるタンパク質モノマー粒子の会合体であ

る。また、ディスクがスプリングワッシャー状に変化して積み重なったもの（図 b, c）が見つかった。コートタンパク質だけの再構成実験では様々な長さの TMV もどきのタンパク質会合体が現れ、会合体の長さは一様ではなかった。また、タンパク質だけの構造形成反応は結晶成長実験に似ていて、20S ディスクが結晶成長のタネに対応することが見出された。

(ii) RNA 上の再構成反応開始部位

精製されたモノマータンパク質と 1 本鎖 RNA を共存させると、RNA 鎖にモノマー粒子が結合し、TMV 構造が再生していく。RNA にタンパク質粒子が結合して結晶成長のような現象が観測されるが、その反応過程はモノマー粒子が RNA 鎖の端から順次結合していくような単純なものではなく、再構成反応は RNA 上の特定の場所から始まり、20S ディスクが重要な構造因子として関与していることが分かった。図 S-3 は、RNA の

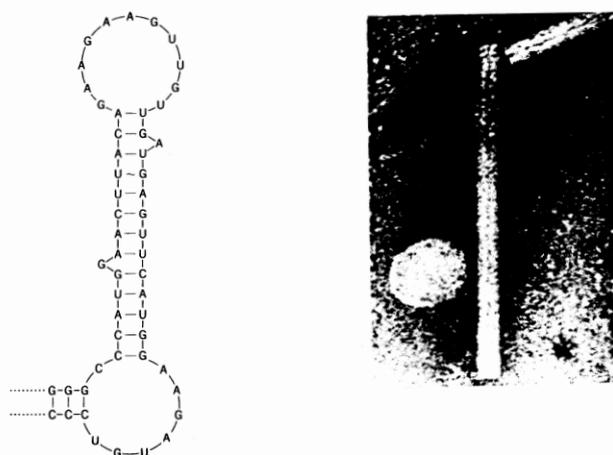


図 S-3 RNA 鎖上の再構成開始部位。左図：1 本鎖 RNA 上に存在する分子内 2 重ラセンと特異的ループ領域。右図：キメラ TMV 再構成実験による反応開始部位の同定。キメラ TMV の電子顕微鏡像において、上部から 1/7 程度下がった部分から電頭像の色が異なっている。この部分のコートタンパク質は OM 株で他の部分は T 株であるため、コートタンパク質特有の抗体結合の様子の違いが観測され、その部分が再構成反応の開始部位である事が分かる。

3' 端から 900 塩基入ったあたりに存在するループ状の RNA 鎖の塩基配列を表している。そこが RNA 鎖とコートタンパク質の複合体形成反応の開始部位であることは、キメラ

TMVの再構成実験から明らかになった。キメラTMVとは、TMVの一部がOM株のTMVのコートタンパク質で覆われ、残りの部分がT株のコートタンパク質で覆われたウィルスである。初めOM株のコートタンパク質を用いて再構成実験を開始し、その後T株のコートタンパク質で再構成実験を継続すると、再構成開始部位近傍はOM株のタンパク質でコートされたキメラTMVが生成される。それぞれのコートタンパク質に特異的に結合する抗体タンパク質を用意してコートタンパク質をラベルし、抗体の結合したTMVの電子顕微鏡像を直接観測して、再構成反応開始部位が決定された。

(iii) 再構成反応途中のTMVの電子顕微鏡像を観測する

1977年、G. Lebeurierは再構成反応途中のTMVの電子顕微鏡写真を撮ることに成功した。そこには驚くべき事実が写っていた。再構成途中でまだコートタンパク質に覆われていない1本鎖RNAは棒状のTMVの片方の端（凸端）から2本露出していて、

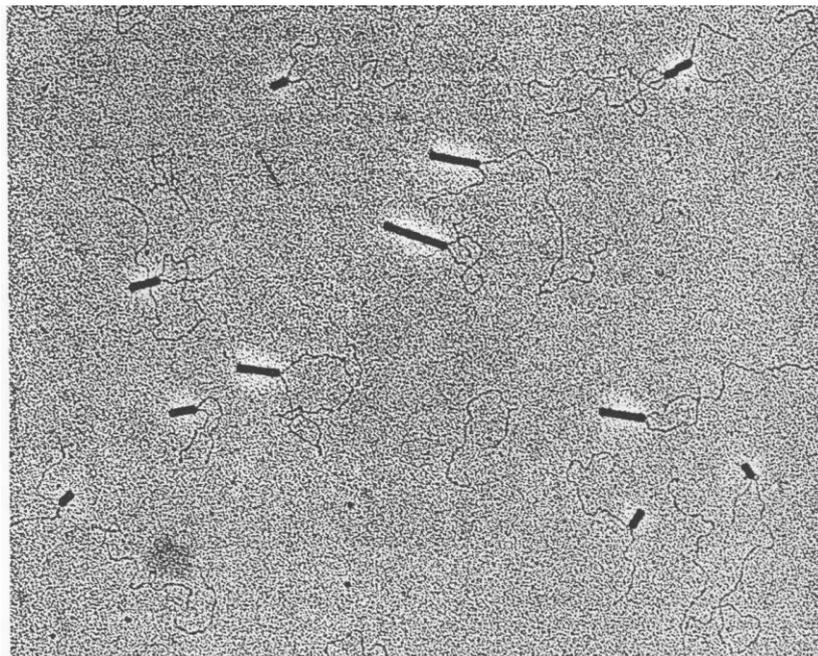


図 S-4 再構成反応途中のTMVの電子顕微鏡像。コートタンパク質と結合していないRNA鎖は棒状粒子の凸端から2本露出している。よく見ると、片方の足は長く、他方は短い。短い足の長さは、いつもほぼ同じであるが、他方の足の長さは様々である。

一方の足は長く、他方の足は短い。短いほうの足（RNA鎖の3'端側）はいつも同程度の長さであるが、他方の足（5'端側）の長さは様々である（図 S-4 参照）。TMVの再

構成反応が進むにつれて、鎖は5'端側の足が急速に短くなり、3'端側の足の長さは変わらない。はみ出した5'端がTMVに吸い込まれて構造形成が起きている事を示唆していた。凸端から2本のRNA鎖が出ていることも驚きであるが、5'端側のRNA鎖だけにタンパク質粒子が結合し、3'端側ではタンパクとの結合が起きていない。つまり、TMV粒子の凸端ではない凹端側でTMVの成長が起きていることを示唆する結果であった。

2) TMVの形態形成反応を原子座標の分解能で解明

(i) TMVコートタンパク質会合体のX線構造解析

1978年、Klugらはタンパク質のみからなるTMVの結晶構造をX線によって構造解析した。その結果、TMVの構造を原子レベルの分解能で解明することに成功した。モノマー

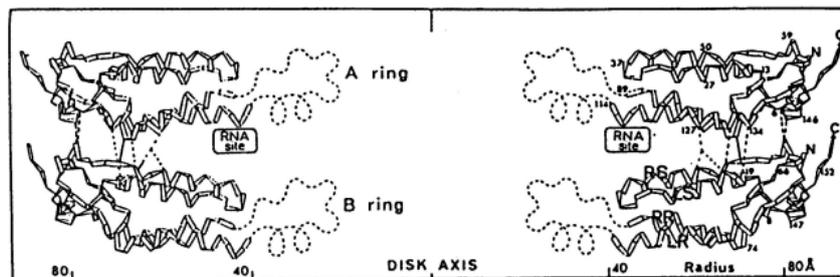


図 S-5 20S ディスクの TMV の X 線構造解析。モノマータンパク質は 4- α ヘリックス・バンドル構造をしていて、ディスクの内側のペプチド鎖は柔らかく X 線像は写っていない。この部分で RNA 鎖と結合することを示唆している。

のコートタンパク質は4本の α ヘリックスが平行に並ぶ 4-helix bundle 構造をしていて、内側の RNA との結合部位はポリペプチド鎖がループ状態になっていて柔らかく X 線像が写らない。17 個のモノマー粒子がディスク状に並び、それが 2 枚重なった外径部分ではモノマー分子が接触して安定な構造を形成しているが、内径の RNA 結合部位は顎のように開いている (図 S-5 参照)。後に解明された RNA と結合した TMV の構造解析からは、その顎の部分に RNA 分子が結合し、コートタンパク質 1 個に対し 3 塩基が結合していることが明らかになった。

(ii) TMV 形態形成反応の分子機構

コートタンパク質会合体の X 線構造解析像と Lebourier が撮った電頭像からの情報

に基づいて、1978年 Butler と Klug は TMV の構造形成に対して非常に魅力的な反応機構を提案した。図 S-6 を用いて、その反応機構の詳細を説明しよう。特に、TMV の凸端から RNA 鎖の2本の足が出ているという事実を説明するためのモデルが構築された。また、TMV の成長に伴って 5' 端側だけが短くなる理由も説明する必要があった。

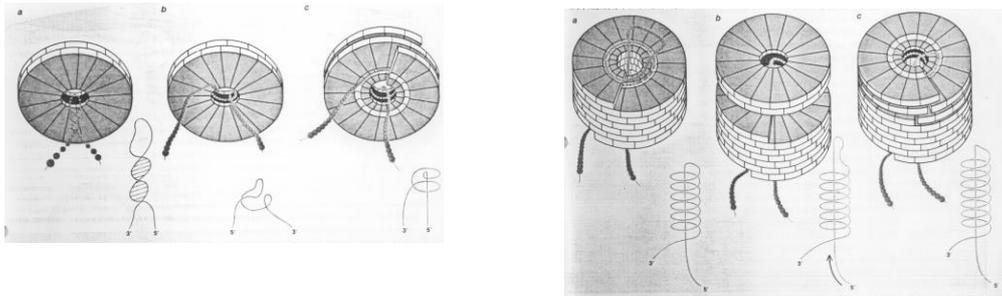


図 S-6 左図：20S ディスクの内部に RNA が結合する様子。右図：(a) RNA 鎖の 5' 端側がヘリックスの穴を通して TMV 粒子の凹部（上端）に引き上げられ、そこに新しく RNA 鎖のループが現れる。(b) そこに 20S ディスクが結合し、(c) 再びディスクがヘリックスに構造変化して凹部方向に TMV の構造形成反応は伸長する。その結果、凸部から露出していた RNA 鎖は 5' 端側が急速に短くなり 3' 端側は凸部に露出したまま残る。5' 端側の構造形成が完了してから、残った 3' 端方向にコートタンパク質の結合反応がゆっくり進行する。

図 S-6 の脚注が、Klug たちが提案した TMV の形態形成反応機構の詳細である。TMV のコートタンパク質は RNA 鎖の片端から順次結合して結晶成長するような単純なものではなかった。長い RNA 鎖がもつれ合うことなくタンパク質との結合反応が進行するためには、再生した TMV の内側の空洞を通して RNA の 5' 端を TMV の上部（凹部）に引き上げて、そこに新たなループを作って 20S ディスクと反応させるという巧妙な反応機構が必要であったのである。この反応メカニズムの直接の実験的証拠はなかったとしても、X 線回折像や電顕像という実験データは、この反応機構を強く支持している。

(iii) 自己組織化する超分子—ウイルス、細菌、細胞内小器官

TMV の形態形成反応が原子レベルの分解能で解明された以後、種々の細胞内器官などの形態形成が分子素子の自己組織化によって自発的に行われているという事実が明らかにされてきた。以下に、いくつかの具体例を示す。

- ① ウィルスの構造形成：ポリオウィルス、fr, MS2, Q_Bファージなど。

- ② 細菌鞭毛の構造形成：サルモネラ菌や大腸菌の鞭毛の構造。
- ③ 頭と尾を持つバクテリオファージの構造形成： λ ファージ、T4 ファージ。分子構築開始のための集合核が最低 3 種並列に構築される。正 20 面体の頭部が形成され、その後、DNA がその頭部に取り込まれる。
- ④ 細胞内小器官・リボソームの構造形成：大腸菌リボソームを用いた研究。20nm 程度の 70S 顆粒（50S と 30S から構築、rRNA とタンパク質の巨大な分子構築物）の構造形成反応。タンパク質の相対配置、タンパク質の分子構造もすでに解明されている。分子構築物の反応機構だけでなく分子進化の点で非常に興味深い分子器官。
- ⑤ 筋繊維の構造とスライディング（筋収縮）の分子機構。最近、タンパク質の構造解析が大きく進展した。筋収縮の機構についても、1 分子観測などの方法が進歩して生体巨大分子の運動に関して詳細な研究が進行中。

以上の実験事実は生物が巨大な分子構築物である事を明瞭に示している。その巨大分子構造は、構成分子間の相互識別反応に基づいて行われる自発的構造形成反応によって構築される。設計図は巨大分子自身の物理・化学的構造に書き込まれている。どれほど複雑な生物組織の形態形成であっても、基本的には構成分子が与えられた瞬間、その物理・化学的な分子間識別反応によって決まっているのである。

おわりに：

生物物理学という学問が何であったのか、その意味が曖昧になってきていると感じる。特に最近、生命という物質に様々な研究分野からアプローチが試みられ、生命科学という言葉が定着し、生命を分子構築物と考えることは「あたりまえ」のように思われている。生命科学分野の物理学と化学は融合して分子構造化学として確立し、生命現象を物理の言葉で記述する分野は情報科学や計算機科学と融合して、**Bioinformatics** と称されるようになってきた。生物物理学とは何であったのか、生物を観測する物理学的測定技術の開発であったように思われることもある。しかし、生命を物質として最初に原子・分子論的立場から物理学的研究の対象にしたのは「生物物理学」という学問であった。気体や固体と同じレベルで生命を研究しようとした志は生物物理学の原点である。**Heitler-London** 力しか知らなかった時代に X 線結晶構造解析でタンパク質や核酸の構造を究明しようとした初心は忘れてはならないと私は思うのである。

私は大学で物理を教育・研究するようになり、生物物理学の研究室という看板を掲げるようになって、生物物理学とは何かと問い続けてきた。世間的にはなかなか理解してもらえなかったと自覚している。「構造生物学」とか「生物物理学特論」という名前で大学院の講義を行ってきたが、学生の反応は冷やかであった。なぜか、生物という言葉と物理という言葉が共鳴しなかったのだと思う。しかし、前述のように、分子構築物としての生命を研究対象にし、現代科学の一大分野を開拓したのは「生物物理学」のパイオニアたちであったことは事実であり誇りに思っている。それがこのテキストを書き残した私の強い動機である。