

## 生命分子科学：特に G タンパク質について

津田 穰

千葉大学薬学部薬品物理化学研究室, 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町

## Molecular Science of the Living Organism: The Case of G-Proteins

Minoru TSUDA

*Laboratory of Physical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University,  
Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan*

(Received March 22, 2001)

The concept of Molecular Science of the Living Organism was described, where the living state is explained as the purposive flows of the quantum mechanically controlled chemical reaction systems which support the homeostasis of the living organism. In the 21st century, the post genomic sequence era, the concept may be a self-evident truth. Molecular Science of the Living Organism was presented in the case of G-proteins: i.e., the atomically controlled mechanism of 1. the carcinogenesis which originates from the point mutation of ras p21, 2. the activation of a receptor protein at the cell membrane, especially in the case of bacteriorhodopsin, 3. the activation of an inactive G-protein by the activated receptor protein.

**Key words**—Molecular Science of the Living Organism; point mutation of ras p21; carcinogenesis; activation of receptor protein; activation of G-protein; atomically controlled mechanism

## 1. はじめに

## 1-1. 医薬を考察する立場から生命を捉える

医薬は分子である。分子が、なぜ、病気を治すのであろうか？

生命を「生物体が正常に生きている状態」と定義しよう。正常に生きている生物体の第一の特徴は、その恒常性を維持していることである。この状態を健康と定義すれば、生命体の恒常性が失われた状態が「病気」であり、医薬は病気になった生命体と相互作用することによって、その恒常性の回復に関与する分子である。1-2. で論ずるように、量子力学的基礎方程式を用いると、自然界において分子が他者と相互作用する現象を化学反応と定義できる（この定義は常識的な化学反応のそれより広い）。すなわち、医薬分子は化学反応によって生命の恒常性を回復するのである。医薬が生命体にとって異物であることを認識すると、この考察から、「生命体の恒常性の維持にはもともと化学反応が使われている」こと、「医薬分子が、元来は、無関係であった生命体内の化学反応に関与することによって生命の恒常性の回復に役立っている」ことがわかる。

以上の考察から、我々は、生命を「その恒常性を維持するために合目的に組織化された多数の化学反応の連続した流れ」と定義することができる。この定義に従えば、人間とは「良好な環境の中に居るときは、御飯さえ食べていれば健康を保つようにシステム化された多数の化学反応の恒常的な流れ」である。

**1-2. 分子科学** 分子科学を「量子力学的物理法則に基づいて構築する分子の科学」と、定義しよう。1929年、ディラックは、「物理学の大部分と化学の全体の数学的理論に必要な量子力学的物理法則は完全にわかっている」と述べた。<sup>1)</sup> 非相対論的量子力学の物理法則を表現するシュレディンガー方程式(a-1)に化学の全体が含まれている<sup>2)</sup>というのが、ここでのディラックの見解である。

シュレディンガー方程式(a-1)の解は、シュレディンガー関数(状態関数)(a-2)で与えられるが、この関数の独立変数は、いま考えている化学反応系に含まれるすべての原子核及び電子の1つ1つについての「スピン座標と我々の住んでいる三次元空間での位置座標」である(Fig. 1)。(a-2)において、

本総説は、平成12年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述したものである。

電子の座標は小文字 ( $x_i, y_i, z_i, \xi_i$  ( $i=1, 2, \dots, N$ )) で原子 (原子核) の座標は大文字 ( $X_\alpha, Y_\alpha, Z_\alpha, \Xi_\alpha$  ( $\alpha=1, 2, \dots, \nu$ )) であらわされている。分子の立体構造がわかっていると、すべての原子の位置座標 ( $X_\alpha, Y_\alpha, Z_\alpha$  ( $\alpha=1, 2, \dots, \nu$ )) の値が定まるから、シュレディンガー方程式の独立変数は、電子の座標だけになる。立体構造の定まった分子についてシュレディンガー方程式を解くと、その立体構造に対応する固有のエネルギー値が求まる。ここに求められたエネルギーを断熱ポテンシャルエネルギーと呼ぶ。断熱というのは、原子の運動エネルギーを含まない (零である) という意味である。分子の構造が変化すると、それに対応して断熱ポテンシャルエネルギーの値が変化する。

ここで分子の構造変化とは、式 (a-2) の大文字 ( $X_\alpha, Y_\alpha, Z_\alpha$  ( $\alpha=1, 2, \dots, \nu$ )) の値が変化することである。式 (a-2) は、反応系、すなわち反応する二個以上の分子、溶媒などを含めて書くことができるので ( $X_\alpha, Y_\alpha, Z_\alpha, \Xi_\alpha$  ( $\alpha=1, 2, \dots, \nu$ )) が変化することを、「化学反応が起こる」と定義する。この定義に従えば、化学反応とは、共有結合の生成や切断のような限られた現象だけでなく、2つの分子の位置が近づいたり遠ざかったりする現象、例えば、薬物分子が受容体タンパク質に近づく現象なども含めることができる。

ここに定義した化学反応の様子は量子力学的基礎方程式 (a-1) によれば、断熱ポテンシャルエネルギー変化で記述できる。このことは、とりもなおさず、「化学反応が断熱ポテンシャルエネルギーによ

って支配されている」ことを意味する。断熱ポテンシャルエネルギーの値が反応系の立体構造によって一義的にただ1つ定まることを思い出せば、この考え方をを用いることにより、新しい特別な化学反応の設計、新しい薬理作用を持つ特別な医薬の分子設計、等々に、無限の可能性が開かれることが納得できるであろう。

**1-3. 生命分子科学-生命を分子科学的方法で解明する** 1-1. で得られた結論に従えば、生命は「その恒常性を維持するために合目的的に組織化された多数の化学反応の連続した流れ」である。すなわち、生命の本質は化学反応であるから、量子力学的基礎方程式から出発して、生命科学を「原子レベルの精密さ」で構築することができる。これが生命分子科学の基本的な考え方である。

さて、状態関数 (a-2) の大文字 ( $X_\alpha, Y_\alpha, Z_\alpha, \Xi_\alpha$  ( $\alpha=1, 2, \dots, N$ )) は、もともと、原子の座標をあらわす独立変数であるから、反応系の立体構造がわからなくても、反応系に含まれている原子の種類とその数がわかれば基礎方程式 (a-1) を解くことができる。しかし、例えば小さな分子  $C_6H_6$  を考えてみても、ベンゼン、ベンツバレン、プレフルベン、デュワーベンゼン、フルベン等が存在することからもわかるように、生命体を構成する高分子物質タンパク質の分子式や一次構造のみがわかっている、立体構造が不明の場合には、式 (a-1) を解くことは事実上不可能である。少なくとも、計算にかかる前に、おおよその立体構造の予測ができていないことが望ましい。

$$H\Psi_m = E_m\Psi_m \quad (a-1)$$

$$\Psi = \Psi(x_1, y_1, z_1, \xi_1, \dots, x_i, y_i, z_i, \xi_i, \dots, x_N, y_N, z_N, \xi_N, X_1, Y_1, Z_1, \Xi_1, \dots, X_\alpha, Y_\alpha, Z_\alpha, \Xi_\alpha, \dots, X_\nu, Y_\nu, Z_\nu, \Xi_\nu) \quad (a-2)$$

但し

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m} \sum_i^N \left( \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) - \frac{\hbar^2}{2} \sum_\alpha^\nu \frac{1}{M_\alpha} \left( \frac{\partial^2}{\partial X_\alpha^2} + \frac{\partial^2}{\partial Y_\alpha^2} + \frac{\partial^2}{\partial Z_\alpha^2} \right) - \sum_\alpha^\nu \sum_i^N \frac{Z_\alpha e^2}{|R_\alpha - r_i|} + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N \sum_{i \neq j}^N \frac{e^2}{|r_i - r_j|} + \frac{1}{2} \sum_{\alpha \neq \beta}^\nu \sum_{\alpha \neq \beta}^\nu \frac{Z_\alpha Z_\beta e^2}{|R_\alpha - R_\beta|}$$

$$|R_\alpha| = \left( X_\alpha^2 + Y_\alpha^2 + Z_\alpha^2 \right)^{1/2} \quad |r_i| = \left( x_i^2 + y_i^2 + z_i^2 \right)^{1/2}$$

$$h = \frac{h}{2\pi}, \quad h: \text{プランク定数}, \quad e: \text{電子の電荷},$$

$$m: \text{電子の質量}, \quad M_\alpha: \text{原子}\alpha\text{の質量}, \quad Z_\alpha: \text{原子}\alpha\text{の原子番号}$$

Fig. 1. Schrödinger Equation of a Reaction System

構造生物学の発展により、ここ10年ほどの間にX線結晶構造解析及びNMRにより立体構造が決定されたタンパク質の数は1万個以上にのぼり、さらに毎年3千個近くが新たに追加されつつある。<sup>3)</sup> X線結晶解析やNMRで決定された立体構造は、生きている生物体内のタンパク質の近似構造と考えられるので基礎方程式(a-1)を解くための初期データとして使うことができる。

我々は、1988年にチトクロームP450camのX線結晶構造解析データが公表されて以来、P450,<sup>4-7)</sup> HIV-1プロテアーゼ<sup>8-10)</sup>、 $\beta$ -ラクタマーゼ<sup>11)</sup>、キマーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、DNAグリコシラーゼ、A-キナーゼ<sup>12)</sup>、Ras p21<sup>13)</sup>、Sos-Ras p21、バクテリオロドプシン<sup>14)</sup>、ミオシン等の公表されたX線結晶データ、中性子線回折データ、NMRデータを用いて生命分子科学の研究を遂行してきた。しかし、研究を進めていくうちに、このやり方で生命の全体像の解明に到達できるかどうか疑わしくなってきた。2.で説明するように、我々は生命分子科学的研究により、Ras p21の点変異による発がんメカニズムの解明に成功したので、これを一般の発癌機構の解明に発展させるべく、細胞周期の問題に取り組むことにした。ところが、細胞周期に関連する生体物質群についてのX線構造解析はほとんど行われていないのである。

ところが、1999年にヒトゲノムの90%以上が解明されるに至り、事情は全く変わってきた。すなわち、生命分子科学の基本的な構想である「生命の恒常性を維持するために合目的的に組織化された多数の化学反応の連続した流れ」を解明する研究過程において、個々の反応を追求するだけでは見え難い「組織化」の実体がゲノムの解明から見えてくるのではないかと。さらに、X線結晶解析を待たずにゲノムデータから生体物質の立体構造を直接的に予測することが可能になるのではないかと。との期待が持てるようになった。2000年1月に国際シンポジウム Quantitative Challenges in the Post-Genomic Sequence Era (San Diego) が開かれ、そこに出席している人々との討論から同様の期待を抱いている人の数は少なくないことを知った。この期待に近づくため、我々もアミノ酸一次配列データからタンパク質の立体構造を予測する研究をはじめた。良く知られているように、タンパク質の立体構造には、1本

鎖の $\alpha$ -ヘリックス、2本以上の鎖間相互作用をもつ $\beta$ -構造、その他無定形部分が混在している。特定のタンパク質の立体構造の中で、なぜ、決まった残基のところでは $\alpha$ -ヘリックスは始まり、終わるのか、なぜ、 $\beta$ -構造は形成されはじめ、その形成は終了するのか。さしあたり、我々はこの2つの問題の解明を基礎方程式(a-1)を用いてはじめることにした。 $\alpha$ -ヘリックスについて立体構造既知の3種類のタンパク質についての研究を終了したが、期待通り、式(a-1)の解が、例外なく、実験事実を予測する結果を得た。

ヒトゲノムの全体を理解することができれば、我々はヒト生命体の中で、ゲノム情報に基づいて産生されるすべての物質を知ることができ、その物質のかかわる反応によって二次的に産生される物質、さらに三次的、四次的、…に産生される物質を知ることができる。このことは、生命を量子力学的基礎方程式に基づいて物質レベルで理解する生命科学が成立することを保証している。このようにして、当初、「医薬を考察する立場」から生まれた素朴な「生命分子科学」は、ゲノム科学の発展により、より広い堅固な基盤の上に構築されることとなった。

前に述べたように、我々は、X線結晶解析データを用いて種々のタンパク質の機能を解明するための研究を数多く行ってきたが、紙数の関係もあり、ここでは、生体内情報伝達機能を担うGタンパク質に関する研究を選んで話をしたい。

## 2. H-ras 遺伝子の点変異による発がんの原子レベルメカニズム

ヒトの第11染色体には、H-ras 遺伝子が存在する。そのコードするタンパク質の12番目のアミノ酸のコドンGGC(グリシン)の2文字目が、ぼうこう癌細胞では、Tに変異し、GTC(バリン)となっている事がわかった。<sup>15)</sup> Ras p21は細胞増殖と分化に関するGタンパク質であり、わずか1文字の変異によってNIH3T3細胞の異常増殖が起こることが、遺伝子合成実験によって確かめられた。<sup>16)</sup> Ras p-21 (Fig. 2(a))は、GTP結合型が活性であり、GTPがGDPに加水分解されると不活性になる。生体内では、このときGAPが共存して加水分解反応を著しく促進するが、Gly12がVal12に変わった変異Ras p21に対して、GAPの促進作用はほとんど認められない。<sup>17)</sup> この加水分解反応性

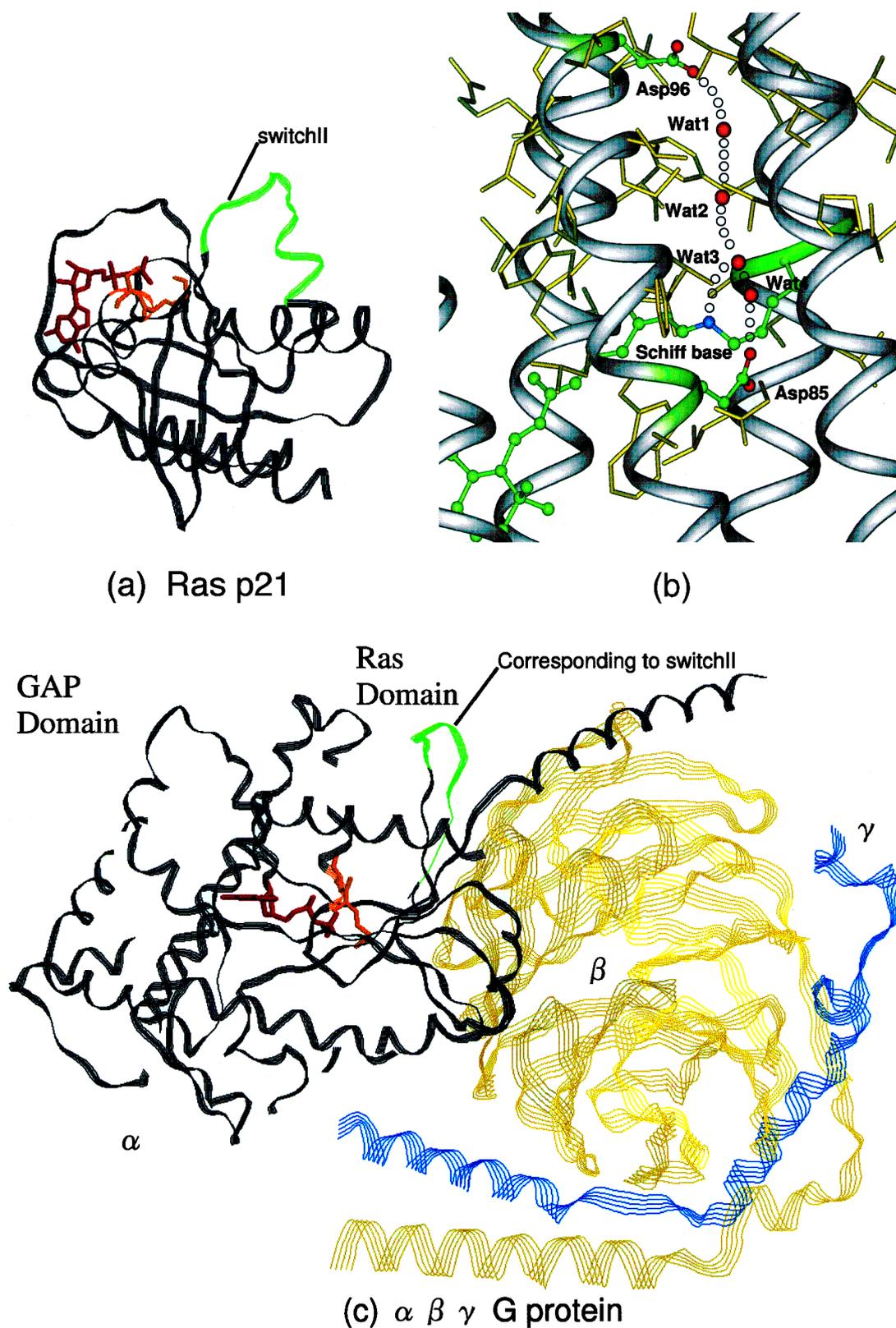


Fig. 2(a). Structure of Ras p21

Switch II, the green chain part, plays an important role in the primary interaction with Sos. GDP is shown in red.

(b). A Part of the Structure of M-Intermediate of Bacteriorhodopsin

The hydrogen bonding chain constructed by water molecules.

(c). Structure of  $\alpha\beta\gamma$  G-protein

The green chain part is corresponding to the switch II of Ras p21. GDP is shown in red.  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  sub-units are corresponding to black, yellow and blue, respectively.

の違いが細胞の異常増殖をもたらすと考えられるので、GTP モデル化合物 ( $\gamma$ -S) を取り込んでいる正常 Ras p21 と変異 Ras p21 の触媒活性部位の原子レベル構造を X 線結晶解析データについて精査したが、有意の違いを見出すことはできなかった。このことは、点変異による Ras p21 機能変化の原因が静的な化学構造の違いによるものではなく、動的な GTP→GDP 変換反応過程にあることを示している。

### 2-1. Ras p21 による GTP→GDP 変換機構

点変異 Ras p21 の GTP→GDP 変換過程の動的メカニズムの異常を知るためには、まず、正常 Ras p21 の GTP→GDP 変換機構を原子レベルで明らかにする必要がある。正常 Ras p21 の働くメカニズムのどこかが、点変異 Ras p21 では狂っているのである。

Ras p21-GTP $\gamma$ S 複合体の X 線結晶解析データが公表されているので、 $\gamma$ S を酸素 O に置き換えて Ras p21-GTP 複合体とし、これを分子動力学計算により、310 K で十分リラックス (1,000 ps) させた。GTP→GDP 反応が起こる反応活性部位の構造を見ると、GTP の  $\beta$  リン酸と  $\gamma$  リン酸は Lys16 と水素結合を形成し、Mg イオンと配位結合している。Mg イオンは 6 座配位であって、 $\beta$ ,  $\gamma$  リン酸の他、Ser17 と Thr35 及び 2 個の H<sub>2</sub>O 分子が配位している。つまり、GTP は、Lys16 との直接結合の他、Mg イオンを介して、間接的に Ras p21 に保持されている。それ以外に GTP と Ras p21 との結合部位は見当たらない。この事実は、後に 4. で G タンパク活性化機構を論ずる時に重要になる。

ここで、 $\gamma$  リン酸に H<sub>2</sub>O 分子が近づく何らかのメカニズムが働くと、Lys16 を介する  $\gamma$  リン酸と  $\beta$  リン酸の水素結合系における連鎖的プロトン移動が原因となって、H<sub>2</sub>O 分子の分解が起こる、と同時に、 $\gamma$  リン酸と  $\beta$  リン酸との間の結合が切れる、ことが、Ras p21-GTP 複合体反応系についてシュレディンガー方程式を解く純理論的研究、により明らかとなった。この反応は、活性化エネルギーの山が 1 つしか存在しない一段階反応であることが証明された。すなわち、反応系について唯一つの虚の振動数をもつ Saddle point の構造を純理論に決定し、その振動の両方向に、最低最短の断熱ポテンシャルエネルギー変化をもたらす反応経路を純理論的に求めると、一方の経路は Ras p21-GTP 複合体 ES complex に到達し、他方の経路は Ras p21-GDP 複

合体+リン酸に到達する、という結果を得た。

**2-2. GAP の役割** 生体内では、GAP (GTPase Activating Protein) (Fig. 2(e)) があらわれると情報伝達活性のある結合体 Ras p21-GTP は不活性な結合体 Ras p21-GDP に変化することが知られている。この事実と、我々が理論的に得た結果とを照合すると、GAP は GTP の加水分解に使われる H<sub>2</sub>O 分子を Ras p21-GTP 結合体の  $\gamma$  リン酸の適切な位置に供給する役割を持っていることがわかる。なぜなら、我々の理論計算によれば、Ras p21-GTP の  $\gamma$  リン酸部位に H<sub>2</sub>O 分子が配位すれば、必ず、GTP→GDP+P の反応が起こることが証明できるからである。もっと詳しく説明すると、通常は、 $\gamma$  リン酸から離れた位置にある Ras p21 の Gln61 が GAP と Ras p21 との相互作用により  $\gamma$  リン酸に近づき、Gln61 と  $\gamma$  リン酸との間に H<sub>2</sub>O 分子を保持するのである。

2-3. で述べる点変異 Ras p21 に対して GAP が無効になる事実も、同じメカニズムで説明できる。

**2-3. 点変異 Ras p21 による発がんの原子レベルメカニズム** 正常 Ras p21 による GTP→GDP 変換反応過程のすべてが原子レベルで解明されたので、この正常反応過程のどこが点変異 Ras p21 で不具合になるのかを見出すことが次の課題である。

正常 Ras p21-GTP 複合体について 310 K で 1,000 ps の分子動力学計算を行った結果、正常複合体が安定に存在することは 2-1. で確かめてある。そこで、Gly12→Val12 点変異 Ras p21-GTP 複合体について同じ分子動力学計算を行ってみると、この点変異複合体の反応活性部位構造が、「こわれたり、正常に戻ったり」の変化を時間的に繰り返していることがわかった。反応活性部位が安定に保たれない場合、GTP の加水分解反応が著しく阻害されるのは当然である。しかも、この反応阻害は時間変化を繰り返す動的な阻害であって、分子動力学計算を用いなければ、見出し難い阻害メカニズムである。この理論計算の結果は、点変異 Ras p21 の結晶構造と正常 Ras p21 の結晶構造が変わらないという X 線結晶構造解析の実験を良く説明する。次に、GAP の加水分解促進効果が 85% 以上失われる実験事実とも合致する。すなわち、GAP によって加水分解に関与する H<sub>2</sub>O 分子を供与されても、ES complex の構造がこわれるので加水分解反応は進行しない。

しかし、正常構造に戻る時もあるので、加水分解反応が起こる可能性は残され、GAPが完全に無効になることはないのである。

ところが Gly12→Pro12 点変異 Ras p21-GTP 複合体について、310 K, 1,000 ps の分子動力学計算を行った結果、この点変異複合体は安定に存在し、正常複合体の場合と同じであることがわかった。Ras p21 に Gly12→Pro12 点変異が起った場合には発がんは誘導されないことは良く知られている事実である。

Gly12, Val12, Pro12 の各 Ras p21-GTP 複合体についての分子動力学計算によって得られた構造変化を較べると、Val12 の場合はペプチド主鎖が回転軸となって直角方向に Val のイソプロピル基が運動し、この運動の与えるトルクが点変異複合体の構造の破壊につながっていることがわかった。Gly12 では、Val12 のイソプロピル基に相当する部分が水素原子 1 個であるため、主鎖を動かすトルクを与えることができず、Pro12 の場合は、Pro12 自身が主鎖にリングを形成してペプチド主鎖を補強する構造をとっているため、Val12 の場合と異なって ES complex を安定に保持するものと考えられる。

### 3. 受容体タンパク質の機能発現の原子レベル機構

G タンパク質の関与する 1 つの例は、視覚のメカニズムである。目の網膜には 11- シスレチナールシッフ塩基が結合したタンパク質、ロドプシン、が存在し光を吸収するとトランス型に異性化する。これをバソロドプシンと呼ぶが、このときシッフ塩基はプロトン化されている。シッフ塩基のプロトンがその近傍の Glu113 アニオンに移りメタロドプシン II に変わると、これが休止状態の G タンパク質と相互作用して GDP を追い出す。そうすると、代わりに GTP がはいて G タンパク質は活性化する。1 個の光子によって 1 個のメタロドプシン II が生成し、1 個のメタロドプシン II によって約 500 個の G タンパク質が活性化する。これは、生命体に備わっている増幅機構の一例である。

ロドプシンは、G タンパク質を活性化するホルモン、アドレナリンの受容体と同じモチーフの 7 回貫通膜タンパク質であるが、ロドプシンでは光がホルモン受容体におけるホルモンに代わって同じ作用をする。G タンパク質の活性化をもたらす受容体

タンパク質の原子レベル機能の詳細を知ることは興味深い。ロドプシンと良く似たバクテリオロドプシンはいろいろの測定技術の適用がしやすいため、ロドプシンよりも多くの実験事実が知られている。そこで、我々は、まず、バクテリオロドプシンの機能を原子レベルで明らかにする研究を行った。

バクテリオロドプシンにはオールトランスレチナールシッフ塩基が存在し、光を吸収すると、これが 13- シス型に変化し、J, K, L, M, N, O と名づけられている中間体が、この順で生成することが知られている。L 中間体まではシッフ塩基がプロトン化されているが、次の M 中間体に変化するときに、このプロトンは近傍の Asp85 アニオンに移る。この M 中間体を生成するシッフ塩基からのプロトン移動がロドプシンにおいて G タンパク質を活性化する機能のあるメタロドプシン II の生成過程と同じ変化である。そこで我々はまずこの過程を原子レベルで明らかにする研究を行った。

**3-1. 水分子はバクテリオロドプシンの働きの本質にかかわっている** バクテリオロドプシンが光を吸収すると、細胞質側から細胞膜の外へとプロトンが一方向に移動する。プロトン移動に主に関与するのは Asp96, Lys216 とシッフ塩基を形成しているレチナール、Asp85 の 3 つである。M 中間体の X 線結晶解析の一例を見ると、Asp96 のカルボキシル炭素とシッフ塩基窒素の距離は 11.41 Å、シッフ塩基窒素と Asp85 のカルボキシル炭素の距離 4.99 Å であり、<sup>18)</sup> これら 3 つの残基間にはプロトンを介する直接的相互作用は存在しない。そこで、これらの 3 つの残基間は水分子のみから成る水素結合連鎖によって繋がれているのではないかと、我々は考えている。このように考えると、L 中間体ではシッフ塩基と Asp85 の間にその距離から考えて少なくとも 1 個の水分子が存在することになる。それでは、なぜ自然は、バクテリオロドプシンの機能発現のために、シッフ塩基と Asp85 の直接相互作用ではなく、その間に水分子を挟む分子設計を選んだのであろうか？

その理由は、我々の研究によれば、水分子が存在しなければ L 中間体が存在し得ないからである。L 中間体と M 中間体がそれぞれ観測されているということは、それぞれがポテンシャルエネルギー超曲面上の異なる 2 つの極小点に存在するというこ

ある。水分子が存在しないと、この2つの極小点が1つになってしまい、それはM中間体の構造をもつことがわかった。すなわち、バクテリオロドプシンというタンパク質単独では期待される機能が発揮できないので、自然はこれに水分子を加えて、生命維持に必要な化学反応の流れを組織したのである。

**3-2. プロトンがL中間体からN中間体へ一方に流れるメカニズム** X線結晶解析によって得られたM中間体の立体構造<sup>18)</sup>を用いて、水分子のみから成る水素結合連鎖によってAsp96、シッフ塩基、Asp85の3つの残基が繋がれていると考えると、シッフ塩基とAsp85とは2個の水分子によって繋がれることになる。このうち「シッフ塩基と直接結合している水分子」はAsp96とシッフ塩基との間を結んでいる「水分子のみからできている水素結合連鎖」にも共用されており、この共用されている水分子の酸素原子は常に2の水素結合連鎖に関与して、分岐の役割を担っている。

シッフ塩基とAsp85とが2個の水分子によって繋がれているのは、シッフ塩基の窒素とAsp85の

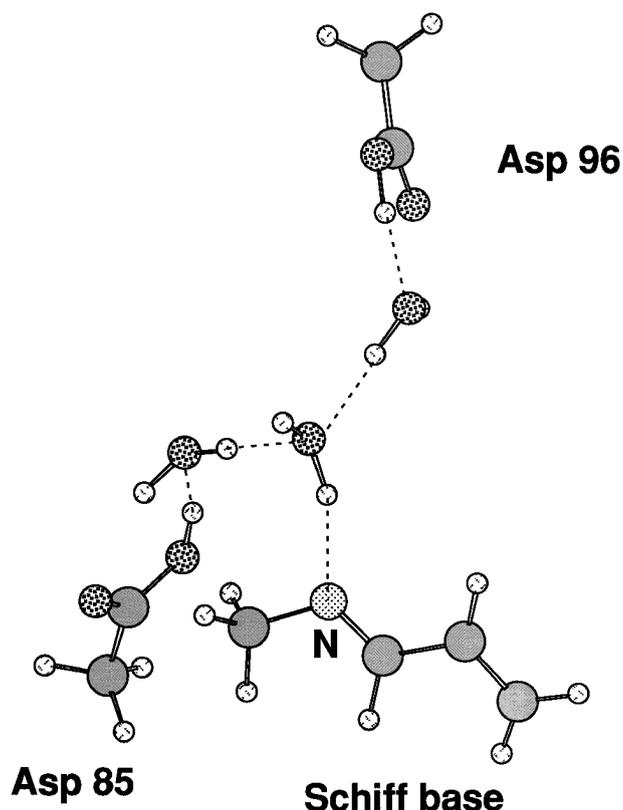


Fig. 3. Model Structure of M-Intermediate  
The ordinary one-way proton flow occurs in this structure.

カルボキシル酸素の向きが互いにねじれており、向き合っていないためである。我々は、まず、Asp96とシッフ塩基の間ならびにシッフ塩基とAsp85の間を、それぞれ2個の水分子から構成される水素結合連鎖（1分子は分岐点を構成するので、全体で3個の水分子）で結び、これをモデル反応系（Fig. 3）として「L→M→N構造変化の反応座標」と「反応の進行に伴うポテンシャルエネルギー変化」を6-31G\*\* ab initio DFT計算によって求めた。その結果、L中間体からM中間体へ変化するときには、これら2個の水分子から構成される水素結合連鎖に含まれる3個の水素結合を介して、3個のプロトンが同時に一方向に移動するトリプルプロトントランスファーがシッフ塩基とAsp85との間で起こることがわかった。この反応の活性化エネルギーの計算値は約9 kcal/molであった。M中間体からN中間体へ変化するときも同じく2個の水分子から構成される水素結合連鎖に含まれる3個の水素結合を介して3個のプロトンが同時に一方向に移動するトリプルプロトントランスファーがAsp96とシッフ塩基との間で起こり、活性化エネルギーは約15 kcal/molであった。さらに、L中間体はM中間体より11 kcal/mol高く、M中間体はN中間体より8 kcal/mol高いことから、L→M→Nの構造変化はポテンシャルエネルギーが単純に減少する方向に生じることがわかった。この計算結果は、L→M→Nの一方向にプロトン移動が起こることを示している。

**3-3. バクテリオロドプシンの構造がプロトンの流れの方向をきめる** 3-2.でL→M→Nの一方向にプロトン移動が起こる原因は、L→M→Nの順にポテンシャルエネルギーが減少するためであることを説明した。このとき、用いたバクテリオロドプシンのモデルではプロトンの流れは「Asp85のカルボキシル基のO←H<sub>2</sub>O←H<sub>2</sub>O←シッフ塩基のN←H<sub>2</sub>O←H<sub>2</sub>O←Asp96のカルボキシル基のO」である。すなわち、シッフ塩基のNを中心としてその構造は対称的であるから、プロトンがN→M→Lの順に逆流しても良さそうに思われる。なぜなら、M→Nの変化に際して、Asp95からシッフ塩基のNにプロトンが移るとき、Asp85は受け取ったプロトンを保持したままだからである。それなのに、なぜ、ポテンシャルエネルギーはL→M→Nの順に減少するのであろうか。

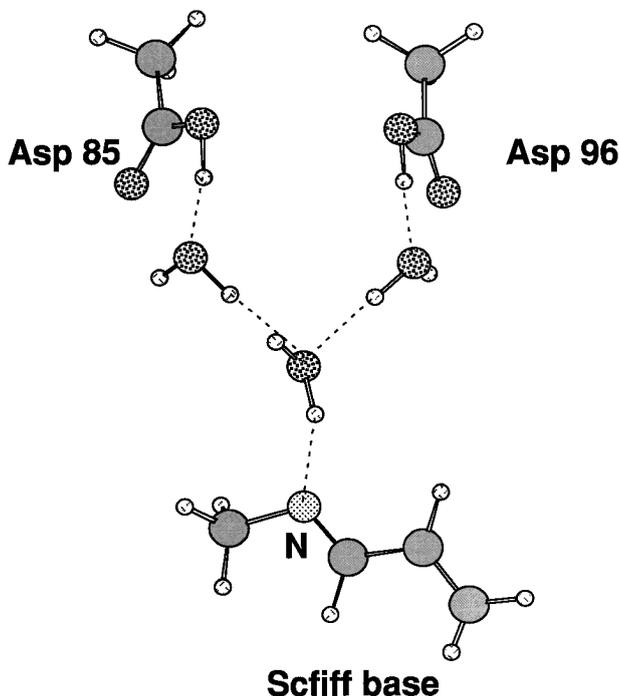


Fig. 4. Model Structure of M-Intermediate  
A backward proton flow occurs in this structure.

そこで、我々は  $N \rightarrow M \rightarrow L$  の順にポテンシャルエネルギーが減少するため、実在のバクテリオロドプシンとは逆の方向にプロトンが流れる構造を見出す研究を行った。その一例は、 Schiff 塩基に直結している  $H_2O$  分子の  $O$  原子と Schiff 塩基の  $N$  原子とをむすぶ直線が対称面に含まれる場合に、 Asp85 と Asp96 とが  $C_2$  対称を満足する構造 (Fig. 4) である。この構造では、  $L \rightarrow M \rightarrow N$  と  $N \rightarrow M \rightarrow L$  のプロトン移動が可逆的に起こり得る。この事実は、バクテリオロドプシンの持つ固有構造によって形成される水分子水素結合連鎖系の空間配置が、生命体が必要とする方向にプロトンの流れを生起していることを物語っている。つまり  $L \rightarrow M \rightarrow N$  の方向にプロトンが流れることによって  $L \rightarrow M \rightarrow N$  の順にポテンシャルエネルギーが低下するのは、バクテリオロドプシタンパク質を構成する原子の空間配置がその機能を発揮するようにゲノム上に書かれているからである。

このように考えると、光子の作用の本質が見えてくる。オールトランスレチナールを持つバクテリオロドプシンと、光吸収によって生ずる 13- シスレチナールを持つバクテリオロドプシンの構造を較べると、オールトランスレチナールの場合には水分子に

よる水素結合連鎖系が途中で断ち切られている。すなわち、光の作用の本質は、トランス-シス異性化を起こしてバクテリオロドプシンのプロトンポンプ作用が起こるように水素結合連鎖系を形成することにあるのであって、プロトンポンプが働く際に光エネルギーが消費されるわけではないのである。実際に 3-2. で示したようにプロトンポンプに必要な活性化エネルギーは約 15 kcal/mol 程度に過ぎず、通常の熱化学反応が容易に起こる程度の値である。

**3-4. M 中間体は一種類ではない** X 線結晶解析によって得られた M 中間体の立体構造<sup>18)</sup>を用いて Schiff 塩基と Asp96 の間に水分子による水素結合連鎖をつくると、実際に必要になる水分子は 3 個であり (3-2. で用いたモデル反応系ではこれを 2 個とした)、 Asp96 と Asp85 の間に水素結合連鎖を形成するためには M 中間体全体で 4 個の水分子が必要である。この X 線結晶解析データ (Fig. 2(b)) に基づく新しい M 中間体モデルから、逆反応によって L 中間体の構造を 6-31G\*\* *ab initio* DFT 計算によって求めると、L 中間体では Schiff 塩基と Asp96 の間にさらに 1 個の水分子が必要 (全体で 5 個の水分子が必要) であることがわかった。つぎに、ここに得られた L 中間体から理論的計算を行って得られる M 中間体 (M1 又は early) の構造を良く見ると、 Asp96 と直接結合している水分子が水素結合系からはみだし、近傍に存在する Thr46 と水素結合をつくることわかった。すなわち、この水分子が除かれるため、 Asp96 と Schiff 塩基との間の水分子が 3 個である M 中間体 (M1 又は early) が生成するのである。

次に、M 中間体 (M1 又は early) から直接 N 中間体が生成すると仮定して、 Asp96 と Schiff 塩基をつなぐ 3 個の水分子を含む水素結合系を介して、4 個のプロトンの協調転移が起こった場合に生成する N 中間体 (N?) の構造を理論計算により得た。ところがここに得られた N? の構造を見ると、 Schiff 塩基と Asp85 との間が広がって、水素結合系が失われていることがわかった。 Schiff 塩基と Asp85 との間に水素結合系が形成されるためには、さらに 1 個の水分子が加わらなければならないが、この水分子は近傍に存在する Thr89 から供給されることが考えられる。したがって、まず、M 中間体 (M1 又は early) の段階で Thr89 から 1 個の水分子

が供給され、構造の異なる M 中間体 (late) が生成し、この M 中間体 (late) を経て正しい N 中間体が生ずると考えるべきであろう。実験的には、<sup>19</sup>3 種類の M 中間体 (early, late, last) が存在することが知られており、水分がすくないときは最終の M 中間体 (last) 生成にいたらず最初の M1 (early) 中間体にとどまることが知られている。この実験事実は、Thr46 や Thr89 に保持されている水分子は Asp96 と Asp85 を結ぶ水素結合連鎖を形成する水分子と異なり、失われやすいと考えれば説明できる。

最終の M 中間体 (last) において、Asp96 とシッフ塩基をつなぐ 3 個の水分子を含む水素結合系を介して 4 個のプロトンの協調転移が起こり、シッフ塩基が再プロトン化されると、N? とは異なる新しい N 中間体の構造が得られる。

ここに得られた新しい N 中間体の水素結合連鎖は L 中間体のそれと同様に全体で 5 個の水分子を含む。L 中間体では Asp96 とシッフ塩基をつなぐ水素結合連鎖は 4 個、シッフ塩基と Asp85 とをつなぐ水素結合連鎖は 2 個の水分子によってそれぞれ構成されている。L 中間体から M 中間体 (M1 又は early) が生成するとき、水素結合連鎖から Thr46 に水分子が 1 個渡されるので、M1 の水素結合連鎖はそれぞれ 3 個と 2 個、全体で 4 個の水分子によって構成されている。ついで、Thr89 から 1 個の水分子が水素結合連鎖系に渡されると M 中間体 (late) が生成し、M (last) 中間体を経て N 中間体へと変化する。したがって、N 中間体、M (late) 中間体及び M (last) 中間体の水素結合連鎖は、それぞれ 3 個と 3 個、全体では 5 個の水分子により構成されている。

以上の結果は、Asp85、シッフ塩基、Asp96 をむすぶ 4 個ないし 5 個の H<sub>2</sub>O 分子から構成される水素結合連鎖モデルについてのシュレディンガー方程式を解く方法により、純理論的に導かれた。実際のバクテリオロドプシンではタンパク質全体の動きが加わるので、ここで得られた結果がすべての実験事実を説明できると期待することは出来ない。ただ、「多くの実験事実と定性的に合致する結果を純理論的に導くことができる我々の水分子による水素結合連鎖モデルはバクテリオロドプシンの光プロトンポンプの構造の本質をあらわしている」と考えてよいのではないかと?

#### 4. G タンパク質活性化のメカニズム

**4-1. G タンパク質と活性化された受容体との相互作用** 受容体膜タンパク質はホルモンの作用で活性化されると休止状態の G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットと相互作用して G タンパク質から GDP を追い出す。GDP がぬけた空間に GTP が入ると G タンパク質は活性化状態に変化する。Ras タンパク質 p21 は G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットと同じように休止状態では GDP と結合しており GDP が GTP に入れ代わると活性化状態に変化する。Ras p21 を活性化するのは、受容体型チロシンキナーゼ RTK に SH2 タンパク質を介して結合する Sos タンパク質である。

Ras タンパク質 p21 と Sos タンパク質が相互作用している構造についての X 線結晶解析データは知られている。<sup>20</sup> しかし、そこには GTP や GDP は含まれていない。Sos と相互作用している Ras p21 の部分は p-loop (10—17), switchII (57—75) である。特に、switchII の Tyr64, Met67, 及び Tyr71 は Sos タンパク質の  $\alpha$ -B,  $\alpha$ -D 及び  $\alpha$ -G ドメインと呼ばれる  $\alpha$  ヘリックス群が環状に集まった疎水コアと強く相互作用し、Tyr64 は  $\alpha$ -G の Phe929 並びに  $\alpha$ -D の Leu872 と、Met67 は  $\alpha$ -B の Ile825 と、Tyr71 は  $\alpha$ -G の Tyr912 と、それぞれ疎水結合している。また、通常、GDP や GTP と共に Mg に配位している p-loop の Ser17 は Sos の Glu942 と結合している (Fig. 5)。

**4-2. 不活性 G タンパクから GDP が抜けるメカニズム** さて、2. に述べたように、我々は Ras p21 に GTP が結合した構造から  $\gamma$  リン酸が加水分解によって失われ GDP が結合した状態へと変化するメカニズムを知っている。Ras p21-GTP 複合体と GDP 複合体の構造の最も大きな違いは、Ras p21 の p-loop の Lys16 が GTP の  $\gamma$ -リン酸と  $\beta$ -リン酸の 2 つと結合しているのに対し、GDP では  $\beta$ -リン酸 1 個とだけ結合していることである。Ras p21 と Sos タンパク質が相互作用している構造では、Lys16 は switchII の Glu62 と結合している。ところが、GDP や GTP と結合している Ras p21 の構造では Glu62 と Lys16 は 13.53 Å も離れている。ここで 2-2. において、GAP タンパク質が Gln61 を  $\gamma$ -リン酸に近づけて加水分解に使われる水分子の供給を行ったことを思い起こそう。Sos タンパク質は、

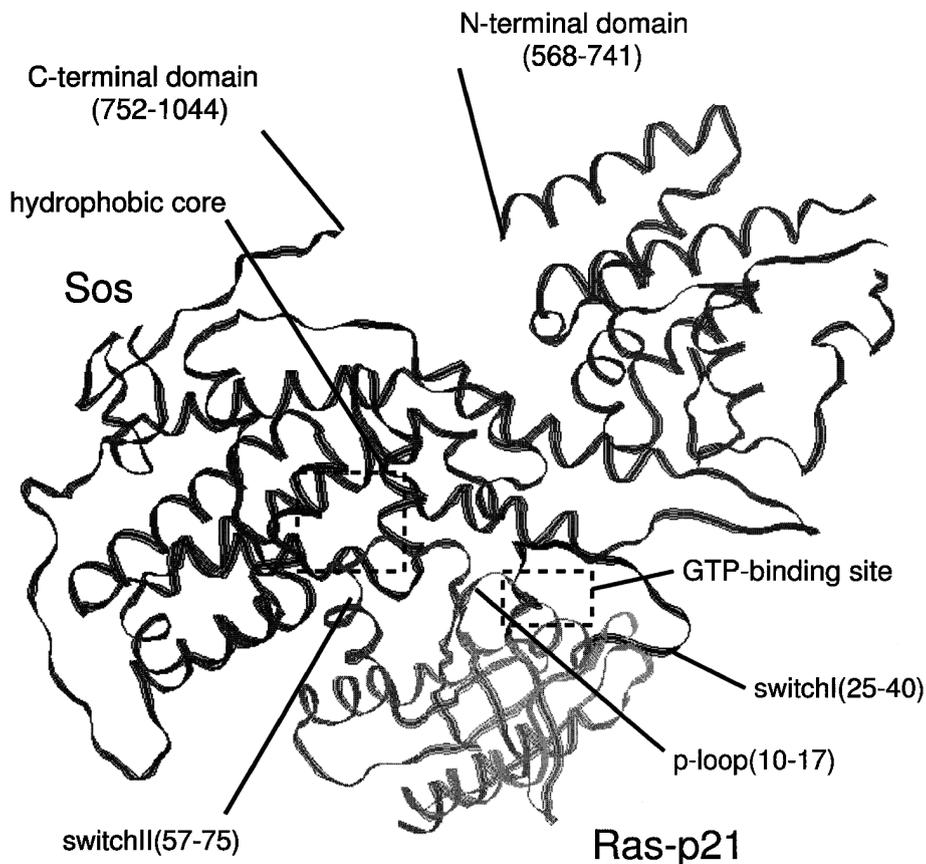


Fig. 5. Ras p21 Interacting with Sos

Ras p21-GDP 複合体と相互作用して GDP をつなぎ止めている Lys16 に Glu62 を近づけてこれと結合を形成させ、Lys16 を GDP から引き離すのである。

そのメカニズムは次の通りであると考えられる。まず、Ras p21-GDP 複合体と Sos が近づき、Ras p21 の switchII (Fig. 2 (a)) の疎水残基 Tyr64, Met67, Tyr71 の部分が Sos の疎水コアの部分と出会うと、疎水基には水分子が附着しないため露出しているの、ここで 4-1. で述べた疎水結合が形成される。この疎水結合生成時に switch II の主鎖の回転が起こる結果、Glu62 は Lys16 の方向に移動し、GDP から Lys16 を奪って結合する。

Ras p21 内部で GDP や GTP を保持しているのは Lys16 の他、Mg である。Mg は 6 座配位であって、その配位子は GTP の場合は  $\gamma$ -リン酸と  $\beta$ -リン酸、p-loop の Ser17, switchI の Thr35 と 2 個の水分子である。<sup>21)</sup> つまり、GTP は Mg を介し、Ser17, Thr35 によって間接的に Ras p21 に保持されている。GDP の場合は Mg の配位子は、 $\beta$ -リン酸、Ser17

と 4 個の水分子であり、Thr35 は 7 Å 以上も離れている。<sup>17)</sup> Sos と Ras p21-GDP 複合体との相互作用によって、Ser17 は、Sos の  $\alpha$ -H の Glu942 と結合し、Mg から離れる。したがって、Sos と Ras p21 の疎水結合相互作用に始まるメカニズムにより  $\beta$ -リン酸と Lys16 との結合が切れ、Ser17 と Mg との結合が切れると GDP を Ras p21 に保持する結合は完全になくなるので、GDP は Mg を抱えたまま Ras p21 から抜けることになる。

このメカニズムを確かめるために、Sos と Ras p21-GDP 複合体の全構造を用いて、Sos との相互作用に従って形成される Sos-Ras p21-GDP 複合体の構造と、その変化に伴うポテンシャルエネルギー変化を分子力学の方法によって求めてみると、Sos-Ras p21-GDP 全構造のポテンシャルエネルギーは上述のメカニズムに従って単調に減少して行くことがわかった。すなわち、このメカニズムは自然界で起こり得ると結論できる。計算に当たっては、Sos-Ras p21-GDP 複合体全構造が水中に存在すると仮定し、H<sub>2</sub>O 分子 6,850 個を発生させて全構造を覆

い、Amber 6.0 の分子力場を用いた。

GDP が抜けた Ras p21-Sos complex の構造には GTP がはいることができる十分大きな空間が存在し、<sup>20)</sup> しかも細胞の GTP 濃度は GDP に比べて大きいので、Mg を抱えた GDP が Ras p21 から抜けると、同じく Mg を抱えた GTP がはいってくる。そうすると Lys16 は  $\gamma$ -リン酸と  $\beta$ -リン酸の 2 つと結合できるようになるため、Lys16 と Glu62 との結合は相対的に弱くなって切れ、Glu62 は 13 Å 以上離れた本来の位置に戻ることができるようになる。自由になった Glu62 の回転により switchII の主鎖が回転すると、Sos の疎水コアと Ras p21 の switchII の Tyr64, Met67 及び Tyr71 との疎水結合が解消される。そうすると、Ras p21 の Ser17 と Sos の Glu942 との結合が切れて Ser17 は Mg と配位し、Sos は Ras p21-GTP 複合体から離れることができる。ついで、switchI の Thr35 は Mg との配位に復帰し、ここに活性化状態の Ras p21-GTP 複合体が生成する。

このメカニズムを確かめるために、Sos と Ras p21-GTP 複合体の全構造を用いて、このメカニズムに伴うポテンシャルエネルギー変化を分子力学法によって求めると、ポテンシャルエネルギーは、このメカニズムの進行につれて単調に減少して行くことがわかった。すなわち、ここに述べたメカニズムは自然界で起こり得るのである。

**4-3. 活性化された受容体の何が G タンパク質を活性化するのか** Ras p21 の場合、活性化された受容体タンパク質の「Ras p21 と相互作用する部位」は Sos である。休止状態の不活性 Ras p21 は GDP を保持しているが、不活性 Ras p21 の活性化、すなわち、Ras p21 からの GDP 追放を開始するのは、Sos の疎水コアと Ras p21 の switchII の Tyr64, Met67, 及び Tyr71 との接触である。それに続いて起こる変化、Ras p21 から GDP の排出、Ras p21-GTP 複合体の Sos からの遊離等、本質的なプロセスはすべて Ras p21 に本来備わっていた内部構造のみに依存していることに注意する必要がある。Ser17 と Sos の Glu942 との結合の形成と解離は附加的な事象に過ぎない。

$\alpha\beta\gamma$  三量体 G タンパク質<sup>22)</sup> の  $\alpha$  サブユニットは Ras 様ドメインと GAP 様ドメインから成るが、Ras p21 の switchII の Tyr64, Met67, 及び Tyr71 に

対応する疎水構造が Ras 様ドメインの同じ位置 (Phe185—Phe195) に存在する (Fig. 2(c))。そこで、上記のメカニズムを  $\alpha\beta\gamma$  三量体 G タンパク質に一般化すると次のようになるであろう。ホルモン受容体やロドプシンの場合も、G タンパク質と相互作用する受容体の「G タンパク質活性化作用を持つ部位」は、Sos の場合と同じように特別な疎水コアである。この疎水コアは通常は細胞膜あるいは受容体タンパク質内部にあって G タンパク質との接触を遮られている。「受容体が活性化されるとこの疎水コアが細胞質内部に露出し、G タンパク質と接触できるようになる」という極めて簡単な機構である。このとき、G タンパク質は露出した疎水コアを認識すればよいのであり、Sos の場合に明らかになったように、「その疎水コアを最初に原子レベルで相互作用する認識部位」と活性化に必要な「GDP を追い出す分子装置」及び、「Ras p21-GTP 複合体を Sos から解放する装置」は G タンパク質側に本来備わっているのである。

受容体活性化のメカニズムを明らかにするためにロドプシンを念頭において、バクテリオロドプシンの光プロトンポンプメカニズムの研究を行い、光プロトンポンプの原子レベル機構の解明については成功を収めた。しかし、シッフ塩基からプロトンが移ることによって受容体内に収納されていた疎水コアが細胞質内部に露出するプロセスで起こる受容体タンパク質の構造変化を原子レベルで解明する課題はまだ残っている。

## 5. おわりに

21 世紀は Post Genomic Sequence Era であるとされる。ヒト生命体について Genomic Sequence が完全に知られれば、ヒト生命体の維持にかかわっているすべての一次物質を知ることができる。これらの一次物質から始まる化学反応は、生命体の恒常性を維持すべく新たな物質を生成する化学反応を生起し、これらの化学反応の流れの組織化は、おのずから、しかも容易に行われる。なぜなら、生命体の中で生成する物質は、その機能を発揮する高次構造を、「おのずから、しかも容易に、短時間で」とることができるはずだからである。もし、生命体維持のための機能物質の生成や、生命体の恒常性を維持するための化学反応の組織化が、その生命体の存在する環境条件下において困難になり、長時間を要す

るようになった場合には、その生命体は死に至るため、生命科学の対象として観察されることはないであろう。生命体の存在する環境の中で最も起こり易い化学反応（式(a-2)の大文字の変化）を見出すことが、生命科学を原子レベルの精密さで構築するための指導原理であり、生命分子科学はその基礎データを与えるものと期待される。

#### REFERENCES

- 1) Dirac P. A. M., *Proc. Roy. Soc. (London)* **A123**, 714 (1929).
- 2) Fujinaga S., Bunshikidoho, Iwanami, Tokyo, 1980, p. 3.
- 3) Protein Data Bank; www.rcsb.org/pdb
- 4) Hata M., Hoshino T., Tsuda M., *Chem. Commun.*, 2037 (2000).
- 5) Hata M., Hirano Y., Nishida R., Hoshino T., Tsuda M., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, (2001) Accepted for Publication.
- 6) Hata M., Nishida R., Ohmori N., Tsuda M., *JCPE J.*, **12**, 195 (2000).
- 7) Hata M., Nishida R., Ohmori N., Tsuda M., *JCPE J.*, **12**, 317 (2000).
- 8) Okimoto N., Tsukui T., Hata M., Hoshino T., Tsuda M., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7349 (1999).
- 9) Okimoto N., Tsukui T., Kitayama K., Hata M., Hoshino T., Tsuda M., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5613 (2000).
- 10) Okimoto N., Kitayama K., Hata M., Hoshino T., Tsuda M., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **543**, 53 (2001).
- 11) Hata M., Fujii Y., Ishii M., Hoshino T., Tsuda M., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 447 (2000).
- 12) Hirano Y., Hata M., Hoshino T., Tsuda M., *JCPE J.*, **12**, 119 (2000).
- 13) Futatsugi N., Hata M., Hoshino T., Tsuda M., *Biophys. J.*, **77**, 3287 (1999).
- 14) Murata K., Fujii Y., Enomoto N., Hata M., Hoshino T., Tsuda M., *Biophys. J.*, **79**, 982 (2000).
- 15) Taparowsky E., Suard Y., Fasano O., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M., *Nature*, **300**, 762 (1982).
- 16) Kamiya H., Miura K., Ohtomo N., Koda T., Kakinuma M., Nishimura S., Ohtsuka E., *Jap. J. Cancer Res.*, **80**, 200 (1989).
- 17) Milbourn M. V., Tong L., de Vos A. M., Brünger A., Yamaizumi Z., Nishimura S., Kim S. H., *Science*, **247**, 939 (1990).
- 18) Sass H. J., Büldt G., Gessenich R., Hehn D., Neff D., Schlesinger R., Berendzen J., Ormos P., *Nature*, **406**, 649 (2000).
- 19) Rödiger C., Chizkov I., Weidlich O., Siebert F., *Biophys. J.*, **76**, 2687 (1999).
- 20) Boriack-Sjodin P. A., Margarit S. M., Bar-Sagi D., Kuriyan J., *Nature*, **394**, 337 (1998).
- 21) Pai E. F., Krenzel U., Petsko G. A., Goody R. S., Kabsch W., Wittinghofer A., *EMBO J.*, **9**, 2351 (1990).
- 22) Lambright D. G., Sondek J., Böhm A., Skiba N. P., Hamm H. E., Sigler P. B., *Nature*, **379**, 311 (1996).