

学位論文

粗視化モデルを用いたバクテリオロドプシンの
力-距離曲線の計算機シミュレーション

名古屋大学 大学院理学研究科 物質理学専攻(物理系)

理論生物化学物理研究室 (TB 研)

山田達矢

平成 29 年 3 月 27 日

目次

本文

アブストラクト	3
イントロダクション	3
- 膜タンパク質の強制アンフォールディング実験	3
- 概要	4
- 仮説と検証の手段	5
イントロダクション補足	6
- 先行研究が解明した事	6
- 本研究が取り組む問題	7
- 問題の明確化	7
- 障壁位置への注目	7
- 障壁位置の決定に関与しない相互作用	8
- 障壁位置の決定に関与する相互作用	9
- 平衡状態への注目	10
マテリアル&メソッド	10
- ポリペプチド鎖の粗視化モデル	10
- 相互作用ポテンシャル	11
- シミュレーションの手法と条件	13
- シミュレーション系の検証	14
- 強制アンフォールディングシミュレーション	14
- 架橋ポリペプチド鎖の長さの定義	14
- シミュレーション結果のスケール変換	15
結果	15
- F-D 曲線の解析	15
- ポリペプチド鎖長の頻度のピーク位置	16
- エネルギー障壁位置の比較	17
- アンフォールディング過程	17
考察	21
- 障壁位置を支配する相互作用	21
- シミュレーションと実験結果のその他の一致点	22
- 相互作用と力の関係	23
- エネルギー障壁の形成の仕組み	23
- エネルギー障壁間の遷移過程	25
- エネルギー障壁の大きさと幅	26
- アンフォールディングの経路	26
- 経路の分岐と行き先	26
- 結果及びモデルの問題点	27
- その他	27
サマリー	28

サポーターティングマテリアル

S1 シミュレーション系	29
S2 ポテンシャル定数の算出	39
S3 粒子に働く力とトルク	50
S4 時間発展の手法	53
S5 時間刻み幅の決定	54
S6 膜貫通ヘリックスの安定性の検証	57
S7 ポリペプチド鎖に働く粘性抵抗力	59
S8 ポリペプチド鎖の伸張特性	60
S9 シミュレーションのスケールの変換	62
S10 F-D 曲線の代表例	66
S11 力のピークの分類	66
S12 ピーク情報の統計	70
S13 ポリペプチド鎖の長さの頻度分布	70
S14 エネルギー障壁位置の換算法	70
S15 障壁位置の再現性の統計的検定	74
S16 力のピークの出現パターン	76
謝辞	79
参考文献	81

粗視化モデルを用いたバクテリオロドプシンの力-距離曲線の計算機シミュレーション

名古屋大学大学院理学研究科 物質理学専攻 (物理系) 山田達矢

アブストラクト 原子間力顕微鏡を用いてバクテリオロドプシン (bR) を強制的にアンフォールディングさせる実験では、力-距離曲線 (F-D 曲線) が測定される。この F-D 曲線上には多数の力のピークが出現する。これらのピークは、アンフォールディング中間体がアンフォールディング経路中に存在するエネルギー障壁を乗り越えるときに出現すると考えられる。このエネルギー障壁の形成は、Popot 等によって提唱された二段階モデルと関係している。二段階モデルは、膜タンパク質の安定化機構がエネルギー的に独立な二つの段階に分離できるという事を主張する。ここで、一段階目は、ポリペプチド鎖が個別に安定な膜貫通ヘリックスを形成する段階である。二段階目は、既に形成された膜貫通ヘリックスが会合して三次構造を形成する段階である。

本論文では、一段階目に関する相互作用が、エネルギー障壁の形成にどの程度関与しているかを調べた。この為に、独自のシミュレーション系を開発し、bR の強制アンフォールディングのシミュレーションを実行した。開発した系では、主鎖の一つのペプチド結合を一つの剛体粒子と見なす粗視化モデルによって、ポリペプチド鎖を明示的に扱った。一方、水と脂質膜は陰溶媒モデルによって非明示的に扱った。相互作用ポテンシャルには、一段階目に関する相互作用、即ち、アミノ酸の脂質膜に対する親和性と、主鎖間の水素結合を取り入れた。また、二段階目に関するヘリックス間の特異的な相互作用は、取り入れなかった。

このシミュレーションの解析結果は、実験による F-D 曲線の特徴を良く再現しており、特にピーク位置を正確に再現した。これらの結果は、障壁の形成は主に一段階目の相互作用によって支配されている事を強く示唆している。加えて、エネルギー障壁の形成の仕組み、並びに、アンフォールディングの経路についても議論した。

イントロダクション

膜タンパク質の強制アンフォールディング実験

膜タンパク質は、全タンパク質の種類数のうち約 20~30% を占めている [1, 2]。そして、シグナル伝達、分子輸送及びエネルギー変換 [3] 等の機能を持ち、生物物理学的に重要な研究対象である。膜タンパク質のフォールディング、アンフォールディング、安定性及び構造変化の研究には、分光学的 [4] 及び熱力学的 [5] 測定が多用されてきた。これらの測定には、専らバルク状態の溶液試料が用いられる。それ故、観測値として得られる情報は多数の分子の平均的な姿を反映している。しかし近年、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた実験手法が開発され、新たな実験分野が開拓された。例えば、タンパク質一分子を直接操作して力学的性質を計測する事 [6] や、膜タンパク質を含んだ脂質膜の表面を原子レベルの精度で観察する事 [7, 8] である。

このような実験分野のうちの一つとして、膜タンパク質の強制アンフォールディング実験 [9, 10, 11] がある。本論文では、この実験に纏わる問題を扱う。以下に、実験対象となる膜タンパク質がバクテリオロドプシン (bR) である場合を例として、この実験の手順を概説する [9]。

まず、AFM の基板上に新しく剥いだ雲母板を固定し、その上に bR を含んだ天然紫膜を付着させる。本論文で

は、この雲母もまた、AFM の基板と呼ぶ。その後、紫膜表面を AFM のカンチレバーで走査して、その表面形状を観察する。観察した表面形状から、その表面が細胞質側 (C 末端ループが存在する側) または細胞外側 (N 末端ループが存在する側) のどちらであるのかを識別する [9]。次に、観察した紫膜表面にカンチレバーの針先を ~ 1 s の間、 ~ 1 nN の力で押し付ける。すると、bR の N または C 末端ループが、針先に確率的に付着する。その後、 ~ 40 nm/s の速度で、膜表面と針先を徐々に引き離す。すると、bR はアンフォールドし始める。アンフォールドした部分は膜から連続的に引き出され、膜と針先との間 (この間の距離を D とする) を架橋するポリペプチド鎖 (以下では架橋鎖と呼ぶ) となる。膜と針先の間には、架橋鎖を通して引力 F が働く様子が観察できる。強制的なアンフォールディングの途中には、特別に強い力が必要となる部分が複数存在する。それ故、アンフォールディングがそのような部分に差し掛かると、ポリペプチド鎖の引き出しは抵抗され、アンフォールディングは一旦中断される (図 1(A) 左)。すると、架橋鎖は D の増大に伴ってゴム紐のように引き伸ばされ、張力が増大していく (図 1(A) 中)。ついに張力がアンフォールディングに対する抵抗力に打ち勝つと、引き延された架橋鎖の大きな張力によって、膜内に残存している部分の急激なアンフォールディングが始まる。その結果、架橋鎖は弛緩する (図 1(A) 右)。このような間欠的なアンフォールディン

グの繰り返しによって、鋸歯状のパターンが膜タンパク質の力-距離 (F-D) 曲線上に生み出される (図 1(B))。一連の引き離しは、引力が完全に観察されなくなるまで継続される。この間、F と D の関係は連続的に記録され、基本的な測定データ (以下では F-D 曲線と呼ぶ) となる。

こうして計測された F-D 曲線は、非常に興味深い。なぜなら、F-D 曲線は精細な測定データであり、そこには膜タンパク質に関する多くの情報が埋もれているように見えるからである。しかし今までのところ、F-D 曲線が何を意味し、どのような情報を含んでいるのか、完全には理解されていない。そこで、本研究は、F-D 曲線の意味する所を正確に解明する事を目標とした。この事は、膜タンパク質の強制アンフォールディング現象を理解する為に必要不可欠である。

概要

以下では、本研究が F-D 曲線の意味する所を正確に解明するという目的の為にに行った事を説明する。幾つかの部分では概略の説明のみに留め、詳細はこのセクションの後のイントロダクション内に、複数のセクションに分けて記述した。

まず、膜タンパク質の強制アンフォールディング現象に関する先行研究を調査し、この現象において十分に解明されたと考えられる範囲を明確にした。その結果、次の事が分かった。架橋鎖の残基長を強制アンフォールディングの反応座標として用いると、強制アンフォールディング過程が明瞭に定量的に議論できる。強制アンフォールディングは、その途中で複数の経路がある。F-D 曲線上に力のピークが出現する事は、強制アンフォールディング経路上にエネルギー障壁が存在する事に対応する。以上の詳細は「先行研究が解明した事」のセクションに記述した。

次に、先行研究で解明されていないと考えられる範囲を調査した。そして、次の問題を、本研究において最優先して解明すべき重要な問題と考えた。それは、強制アンフォールディング経路上にエネルギー障壁が形成される仕組みである。本研究は、この問題に関連した先行研究についても調査した。以上の詳細は「本研究が取り組む問題」のセクションに記述した。

三番目に、障壁形成の仕組みを解明する為には何を明らかにすればよいかについて考察し、明確にした。それは、基板が膜に及ぼしている力が、膜内の脂質分子、膜タンパク質、及び、引き抜き対象となっている膜タンパク質のポリペプチド鎖を介して、

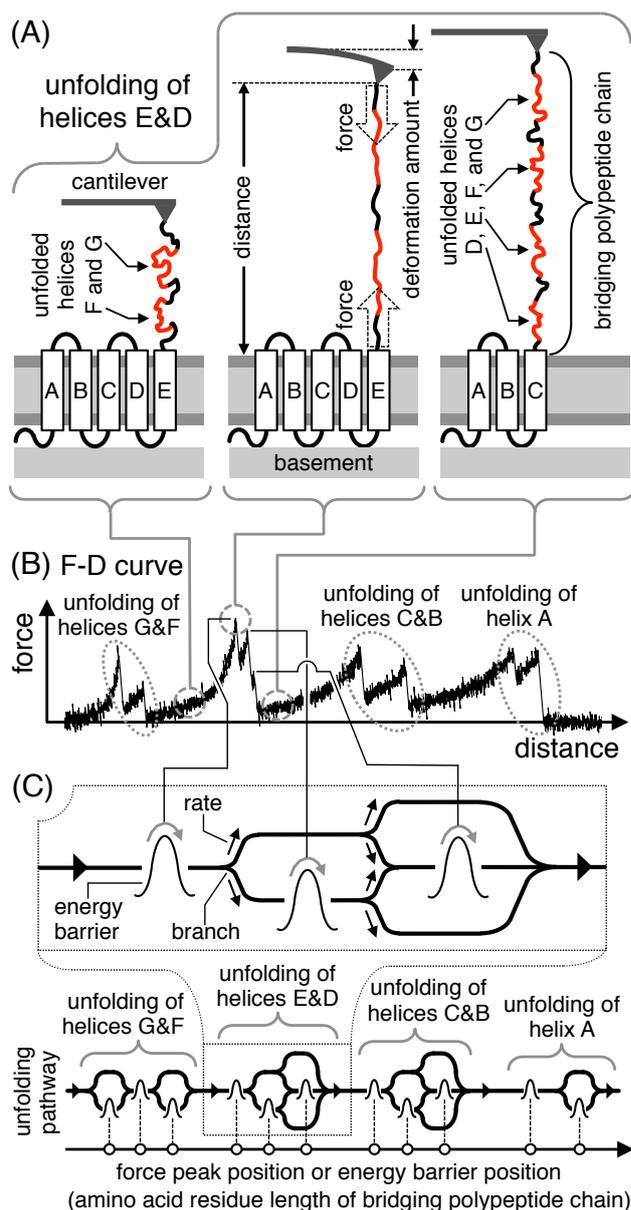


図 1: (A) AFM を用いた bR の強制アンフォールディング実験において、ヘリックス E&D が引き抜かれる様子。図左は、ヘリックス G&F がアンフォールドした直後の様子。図中は、カンチレバーと紫膜間の距離を広げたときの様子。架橋ポリペプチド鎖は緊張した状態にある。ヘリックス E には、架橋鎖を通してカンチレバーから強い引き抜き力が及ぼされている。図右は、ヘリックス E&D が解けた直後。架橋鎖には、両ヘリックスを形成していたポリペプチド鎖が加わり、弛む。(B) bR の強制アンフォールディング実験で計測される F-D 曲線の模式図。F-D 曲線上には多数の力のピークが出現する。この力のピークは、アンフォールディング経路中に存在する自由エネルギー障壁によって生じると考えられる。F-D 曲線上において、図 (A) 左、中、及び、右に対応する部分を灰色の実線で結んで示した。(C) 強制アンフォールディング経路の模式図。下部は、bR の強制アンフォールディング経路の全体の模式図。横軸は、架橋鎖のアミノ酸残基長であり、強制アンフォールディングの進行度を表す。F-D 曲線上に力のピークが出現する事は、アンフォールディング経路上にエネルギー障壁が存在する事に対応していると考えられる。エネルギー障壁の位置は、膜タンパク質の強制アンフォールディング実験において、定量的に測定可能な値の一つである。アンフォールディング経路中には分岐が存在する。分岐先に障壁が存在する場合、力のピークが出現するが、存在しない場合は出現しない。上部は、ヘリックス E&D のアンフォールディングの部分の経路の拡大図。経路上に存在するエネルギー障壁と、それに対応する F-D 曲線上の力のピークとを黒の実線で結び、対応関係を示した。

最終的に架橋ポリペプチド鎖に伝達される様子である。以上の詳細は「問題の明確化」のセクションに記述した。

四番目に、上記で明確化された問題を解明する為の糸口を探った。その結果、エネルギー障壁の位置に注目すべき事、更に、それを支配する相互作用を解明する事が重要だと分かった。その相互作用は、障壁によって出現する力のピークの基本的な大きさや出現頻度をも決定していると考えられる。以上の詳細は「障壁位置への注目」のセクションに記述した。

五番目に、障壁位置を支配する相互作用には「何が含まれていないか」を考察した。その結果、筆者は、標的膜タンパク質と他の膜タンパク質間の特異的な相互作用は含まれていないと推測した。また、標的膜タンパク質内部のヘリックス間の特異的な相互作用も含まれていないと推測した。以上の詳細は「障壁位置に関与しない相互作用」のセクションに記述した。

六番目に、障壁位置を支配する相互作用について考察した。障壁位置に関与しないと推測したもの以外の相互作用は、障壁位置に関与する可能性がある。結果として、アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性、及び、脂質膜中に存在する膜貫通 α ヘリックス内部の水素結合が候補として浮上した。以上の詳細は「障壁位置を支配する相互作用」のセクションに記述した。

七番目に、エネルギー障壁を形成する相互作用について、別の視点から考察した。そして、エネルギー障壁を形成する相互作用は、平衡状態において膜タンパク質を安定化させている相互作用に含まれていると推測した。以上の詳細は「障壁形成と平衡状態」のセクションに記述した。

八番目に、筆者は、先行研究 [12] が注目したように、Popot 等によって主張された「二段階モデル」[13, 14, 15, 16] に注目した。その結果、筆者が推測した障壁位置を支配し得る相互作用は、二段階モデルの内の一段階目に関与する相互作用と等しいという事が分かった。

二段階モデルとは、平衡状態における膜タンパク質の安定性に関するエネルギー的な理論である。Popot 等は、ポリペプチド鎖が折り畳まり、膜タンパク質として脂質膜中に安定に存在する為の仕組みが、エネルギー的に独立な二つの段階に分離できる事を示した。ここで、一段階目はポリペプチド鎖から個別に安定な膜貫通ヘリックスが形成される段階であり、二段階目は形成された膜貫通ヘリックスが互いに会合して三次構造を形成する段階である。彼等は、一段階目に関与する相互作用は、アミノ酸残基の膜への親和性と、膜貫通 α ヘリックスの形成に関与する主鎖間の水素結合であると主張している。つまり、筆者が推測した障壁位置を支配し得る相互作用は、一段階目の相互作用に丁度等しいといえる。また、

彼等は、二段階目に関与する相互作用は、膜貫通 α ヘリックスの側鎖間の水素結合や、膜貫通 α ヘリックスの表面間のぴったりとしたかみ合いであると主張している。加えて、一段階目に関与する相互作用は、二段階目に関与しないと主張している。

仮説と検証の手段

筆者は、上記のように先行研究を調査し考察した結果、次の考えに至った。それは、障壁形成の仕組みを解明する為には、障壁の位置を支配する相互作用を解明する必要があるという事である。そして、筆者は、次の仮説に到達した。それは、「エネルギー障壁の位置は、主に、二段階モデルのうちの一段階目に関与する相互作用が決定する」という仮説である。筆者は、この仮説の妥当性は、次のような方法で検証できると考えた。それは、先ず、単純なポリペプチド鎖のモデルに、一段階目の相互作用のみを与えたシミュレーション系を準備する。次に、このシミュレーション系を用いて、強制アンフォールディング実験の計算機シミュレーションを行うという方法である。もし仮説が真ならば、算出される F-D 曲線上には、実験と同じ位置に力のピークが出現すると考えられる。そして、仮説が真であり、なおかつシミュレーション結果と実験結果の間的一致が大きければ、シミュレーション結果を用いて障壁形成の仕組みやその他の問題にも迫る事ができると考えた。以上の考えを元に、本論文では、以下の事を行なった。

最初に、上記のシミュレーションが行えるようなシミュレーション系を開発した(マテリアル&メソッドを見よ)。この系では、長時間の計算が可能となる単純なポリペプチド鎖の粗視化モデルを用いる。そして、ポリペプチド鎖のモデルに、二段階モデルにおける一段階目の相互作用を与えた。しかし、二段階目の相互作用は意図的に無視した。二段階目の相互作用を取り入れないと、膜貫通 α ヘリックスは、それらを接続するループの長さが許す範囲で脂質膜内を拡散してしまう。そこで、開発したシミュレーション系には、膜貫通 α ヘリックスを一定の領域内に閉じ込める為の相互作用ポテンシャルを追加した。また、開発したシミュレーション系には、水中に存在する α ヘリックス内部の水素結合を考慮した。なぜなら、アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性との整合性を取る為に必要だと気づいたからである。シミュレーションの対象となる膜タンパク質として、bR を選んだ。7回膜貫通ヘリックス構造を持つ bR は [17, 18]、現在のところ強制アンフォールディングの研究において最も広く研究され、実験結果の蓄積が多い。

次に、シミュレーション系の検証をした(マテリアル

&メソッドを見よ)。もし、二段階モデルが正しいならば、開発したシミュレーション系を用いても、bR の七本の膜貫通ヘリックスが個別に安定に存在するようなシミュレーションが実行できるはずである。実際、そうなる事を確かめた。

そして、開発したシミュレーション系を用いて、bR の強制アンフォールディングのシミュレーションを行った。更に、算出された F-D 曲線を解析してエネルギー障壁位置を求めた。その結果、エネルギー障壁の位置が有意に再現される事が確かめられた(「結果」を見よ)。即ち、本研究の仮説は、ほぼ成り立つ事が分かった。

最終的に、シミュレーションの結果を用いて、障壁形成の仕組みを調べた(「考察」を見よ)。加えて、強制アンフォールディング経路中に分岐が存在する仕組み、並びに、分岐の行き先が選択される比率を決定する仕組みについても考察した。

イントロダクション補足

先行研究が解明した事

膜タンパク質の強制アンフォールディング実験では、基本的に F-D 曲線だけが測定データとして得られる。それ故、実験中に生じている現象を明らかにする為には、その現象の一種の「影絵」である F-D 曲線を、定量的、統計的に解析する事が必要となる。先行研究では、bR を用いた実験に伴って観察される現象のあらずじが、以下のように明らかにされた。ただし、基本的な内容は他の膜タンパク質の場合でもほぼ同様である。

強制アンフォールディングの一連の過程は、カンチレバーの針先を紫膜に押し付ける事から始まる。紫膜に押し付けられた針先には、bR の N または C 末端ループが確率的に、物理化学的に付着する(以下では付着ループと呼ぶ)。実際の所、付着部位は引き抜きの後で判明する。つまり、引力が 60~80nm という長距離に至るまで観察されたならば、末端ループに付着していたと判断できる [9]。

膜表面とカンチレバーの引き離しに伴って、bR はカンチレバーから付着ループを通して膜外へ引き出される力を受ける。その結果、bR はアンフォールドし始める。アンフォールドした部分は膜から連続的に引き出され、膜と針先との間を架橋するポリペプチド鎖(以下ではこれを架橋鎖と呼ぶ)となる。

この強制的なアンフォールディングの途中には、特に強い力が必要となる部分が複数存在する。それ故、アンフォールディングがそのような部分に差し掛かると、ポリペプチド鎖の引き出しは抵抗され、アンフォールディ

ングは一旦中断される(図 1(A) 左)。すると、架橋鎖は D の増大に伴ってゴム紐のように引き伸ばされ、張力が増大していく(図 1(A) 中)。ついに張力がアンフォールディングに対する抵抗力に打ち勝つと、引き延ばされた架橋鎖の大きな張力によって、膜内に残存している部分の急激なアンフォールディングが始まる [9]。その結果、架橋鎖は弛緩する(図 1(A) 右)。このような間欠的なアンフォールディングの繰り返しによって、鋸歯状のパターンが膜タンパク質の F-D 曲線上に生み出される(図 1(B))。

F-D 曲線のうちの、D の増大に伴って F が単調に増大していく部分に、Worm-Like-Chain モデルによるフィッティングを施すと、その部分での架橋鎖のアミノ酸残基長が求められる [6]。同一実験条件において得られた多数の F-D 曲線の解析によって、力のピークが出現したときの架橋鎖の残基長は、潜在的に決まっている複数の特定の長さのどれかとなっている事が分かった。この事は、力のピークの出現時においては、bR の膜内に残っている部分は特定の構造を持つ事を示唆している。そしてこの特定の構造が、ポリペプチド鎖の引き出しに対するエネルギー障壁を形成していると考えられる。

実験中の bR の連続的なアンフォールディングに対して、一つのアンフォールディング経路を想定する。すると、アンフォールディングに強く抵抗する状態は、アンフォールディング経路中に存在するエネルギー障壁によって引き起こされると解釈できる。それ故、F-D 曲線上の力のピークの出現パターンは、アンフォールディング経路中のエネルギー障壁の配置パターンに対応していると考えられる(図 1(C))。bR の強制アンフォールディングは、概ね、引っ張られた末端ループから順に起こると考えられている。それ故、以下では、アンフォールディング経路の座標として、実験的に精度良く定量的に測定できる架橋鎖の残基長を使用する。また、力のピーク出現時の架橋鎖の残基長を、その力のピークの位置、また、その力のピークの原因となるエネルギー障壁の位置と呼ぶ。エネルギー障壁の高さと厚さは、様々な引き抜き速度で計測された F-D 曲線を解析する事で求められる。一般的な障壁の高さは $20k_bT$ 程度、幅は 0.3~0.7nm と推定されている [12, 19, 20]。

Oesterhelt 等は、bR は引っ張ったループ側から順にアンフォールディングする事、及び、アンフォールドしていない部分は天然構造を保持し続ける事を仮定した。そして、ピーク位置、及び、ピーク位置の間隔の情報をこれらの仮定に当てはめた。その結果、顕著な力のピークは、ヘリックス対のアンフォールディング、及び、最後まで膜中に残る単独のヘリックスのアンフォールディングに対応している事が見出された [9]。つまり、bR を C 端側から引き抜く実験の場合では、bR はヘリックス G&F、

E&D、C&B、そして、ヘリックス A の順序でアンフォールドする [9]。また、bR を N 端側から引き抜く実験の場合では、bR はヘリックス A&B、C&D、E&F、そして、ヘリックス G の順序でアンフォールドする [21]。更に、ピークの出現をより詳細に説明する為に、「構造セグメント」というものが考案されている [22]。

実験条件が同一であっても、各々の力のピークの出現は試行によって異なり、確率的である。この事から、アンフォールディング経路は途中に分岐を持っていると考えられる (図 1(C))。分岐の行先が選択される比率は、実験的に計測されている [23]。さらに、各分岐の先には異なる障壁が存在する場合もあると考えられている [12, 19, 20, 11]。

この他に、力のピーク位置は、膜タンパク質の種類に固有のパターンを示す事が分かっている [9, 24, 25, 26, 27, 28]。

本研究が取り組む問題

筆者は、膜タンパク質の強制アンフォールディング実験において生じる現象の全体像のうちで、未解明と考えられる範囲について考察した。そして、解明すべき問題を次の三つに整理した。

(i) 強制アンフォールディング経路上にエネルギー障壁が形成される仕組みを解明する事。

(ii) 強制アンフォールディング経路中に分岐が存在する仕組みを解明する事。

(iii) 分岐の行先が選択される比率を決定する仕組みを解明する事。

ここで、最も重要且つ基本的な問題は (i) である。なぜなら、(ii) 及び (iii) は、(i) に付随する問題と考えられるからである。そこで、本研究では (i) の問題について重点的に取り組む事とした。

(i) の問題に関する先行研究として、以下のものが挙げられる。実験的なものとしては、実験条件の変化によって F-D 曲線がどのように変化するかを調べた研究 [23, 29, 12, 30, 31, 19, 20] が存在する。Cisneros 等は、配列中の疎水性部分と親水性部分の繰り返し障壁の形成に関与していると考えしている [24]。また、Voitchovsky 等は、トリプトファン残基の膜界面への吸着が重要であると考察している [31]。また、計算機シミュレーションによる研究では、強制アンフォールディング現象を可視化し、また、相互作用を直接算出できる [32, 33, 34, 35]。Seeber 等は、力のピークの出現は、主に膜貫通ヘリックスの Up-Down 構造に由来し、また、部分的に膜タンパク質内部のイオン結合等に由来するようだと報告している [32]。

以上のように、エネルギー障壁の形成に対して様々な仕組みが提案されている。しかしながら、今までのところ、筆者が調べた限りでは、それらは未だ明瞭に理解されていないようである。

問題の明確化

本研究では、強制アンフォールディング経路上にエネルギー障壁が形成される仕組みを、解明すべき重要な課題と位置づけた。筆者は、この仕組みを解明する為には、次の事を明らかにすればよいと考えた。それは、力のピークの出現時において、脂質膜によって標的膜タンパク質の各々の残基に及ぼされた力が、標的膜タンパク質のポリペプチド鎖が有する一定の構造を通して、架橋鎖と繋がっているアミノ酸残基に伝達される仕組みである。その理由は、以下の通りである。

まず、力のピークは、いつも特定の位置に出現するという事に注目する。この事から、力のピークの出現時には、標的膜タンパク質を構成するポリペプチド鎖のうち、少なくともエネルギー障壁の形成に関与する部分は、いつも一定の構造を有していると考えられる。

次に、力のピークが出現する直前の状況において、標的膜タンパク質に働く力について考える。紫膜は、多数の bR のループ部分を介して基板に吸着している (図 2(A))。しかし、基板の種類を変化させても F-D 曲線の形状、及び、ピークの出現には変化が生じない [23]。この事から、標的膜タンパク質のループと AFM の基板との間の相互作用によって標的膜タンパク質に及ぼされる力は、無視できる程度に小さいと考えられる。すると、標的膜タンパク質に働く力としては、以下の二つだけが考えられる。一方は、基板に吸着している脂質膜が、標的膜タンパク質の各々の残基に及ぼす力である。もう一方は、架橋ポリペプチド鎖が、膜中の標的膜タンパク質に及ぼす力である。両者の力は、ピークの崩壊の直前まで、互いに釣り合っていると考えられる。即ち、ポリペプチド鎖の引き出しに対抗する力は、元をたどれば全て、脂質膜が各々の残基に及ぼす力に起因すると考えられる。

障壁位置への注目

筆者は、前セクションの内容と、先行研究の結果を合わせて考察した。そして、強制アンフォールディング経路上にエネルギー障壁が形成される仕組みを解明する為には、エネルギー障壁の位置を支配する相互作用を解明する事が非常に重要であると考えた。その理由は、以下の通りである。

先行研究を調査した結果、筆者は次の事に気づいた。

それは、複数の研究 [23, 29, 24, 30, 31, 19, 20, 36] が、実験条件の変化に対して、力のピークの大きさや出現頻度は変化するが、力のピークの位置は殆ど変化しないという事を報告しているという事である。更に、膜タンパク質の種類を変化させる場合を除き、実験条件の変化に対して力のピークの位置が変化したという報告は、筆者が探した範囲では、殆ど見つからなかった。

この事から、筆者は、エネルギー障壁の形成に関与する相互作用は、二種類に分けられると推測した。それは即ち、エネルギー障壁の位置を支配する相互作用と、それ以外の相互作用である。そして、エネルギー障壁の形成の仕組みは、次のような構成を持つと推測した。それは、障壁の位置を支配する相互作用のみが、エネルギー

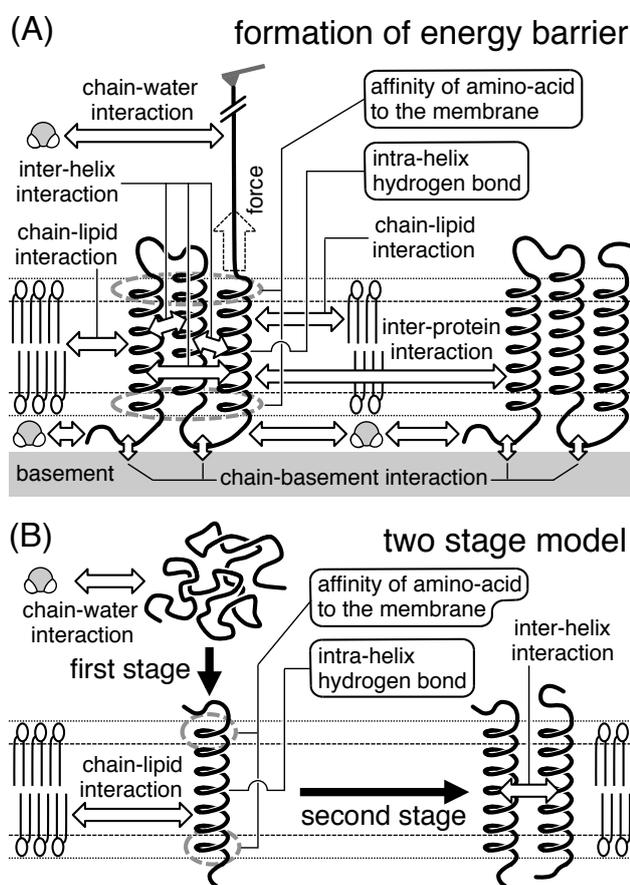


図 2: (A) 強制アンフォールディングの実験系には、様々な相互作用が存在する。本研究では、エネルギー障壁の形成に関与する相互作用として以下の二つに注目した。一方は、アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性である。もう一方は、脂質膜内での α ヘリックス構造の形成に関与する主鎖間の水素結合である。様々な相互作用から、それら二つの相互作用に注目した理由については、本文中に記述した。(B) 膜タンパク質の形成に関する二段階モデル [13, 14, 15, 16]。一段階目は、水中でランダムコイル構造にあるポリペプチド鎖から、個別に安定な膜貫通 α ヘリックスが形成される過程である。二段階目は、一段階目で形成された膜貫通 α ヘリックスが互いに会合し、三次構造を形成する過程である。筆者がエネルギー障壁の形成に関与していると推測した相互作用は、二段階モデルのうちの一段階目に関与する相互作用に等しい。それ故、bR の F-D 曲線は、次のようなシミュレーションによっても再現が可能であると期待できる。それは、一段階目の相互作用のみを考慮した bR のポリペプチド鎖のシミュレーションである。

障壁を設立させ、その位置を決定し、更に、その障壁によって出現する力のピークの基本的な大きさや出現頻度を決定する。それ以外の相互作用は、力のピークの大きさやその出現頻度のみを変化させる事が出来るという事である。

もしそうであるならば、障壁位置を支配する相互作用を調べる事が、障壁形成の仕組みを解明する突破口になりそうである。

障壁位置の決定に関与しない相互作用

筆者は、前セクションの内容と、先行研究の結果を合わせて考察し、次の考えに至った。それは、次の三つの相互作用は、障壁位置を支配する相互作用ではなさそうだという事である。それらの相互作用とは、標的膜タンパク質の構造変化において変化する相互作用、標的膜タンパク質と脂質膜に含まれる他の膜タンパク質との間の特異的な相互作用、及び、標的膜タンパク質を構成する膜貫通 α ヘリックス間の特異的な相互作用である。その理由は、以下の通りである。

まず、筆者は、障壁位置を支配する相互作用(即ち、力のピークの位置を決定する相互作用)には、”何が含まれていないか”を考えた。この事は、実験条件の違いによってピークの位置が殆ど変化しなかったと言う実験的研究からわかる。つまり、それらの研究で行われた実験条件の変化に伴って変化すると思われる相互作用は、障壁位置を支配する相互作用ではないと考えられる。調査には、F-D 曲線の形状のみの記載があり力のピーク位置が明記されていない論文の結果もまた利用した。その場合は、記載された F-D 曲線の形状を用いて、筆者が力のピーク位置に変化があったかどうかを判断した。ヘリックス間相互作用は、特異的な部分と非特異的な部分に分割して考慮した。ここで、ヘリックス間相互作用の内の非特異的な部分とは、膜中に存在する脂質分子と膜貫通ヘリックスとの間の相互作用と同一の性質を有する部分の事であると定義する。そして、ヘリックス間相互作用の内の特異的な部分とは、非特異的な部分に含まれない部分であると定義する。膜タンパク質間相互作用についても、同様に特異的な部分と非特異的な部分に分割して考慮した。調査の結果は、以下のように纏められる。

(I) 標的膜タンパク質の構造変化において変化する相互作用は、障壁位置を支配する相互作用ではなさそうである。Müller 等の論文 [23] では、光サイクルの基底状態にある bR の F-D 曲線と、M 中間状態に類似した構造を取る変異体 bR の F-D 曲線が比較されている。しかし、両者の F-D 曲線の形状の間に大きな違いは見出されなかった。

(II) 標的膜タンパク質と脂質膜中に含まれる他の膜タンパク質との間の特異的な相互作用は、障壁位置を支配する相互作用ではなさそうである。Sapra 等は、bR の会合状態の変化によってピーク位置が変化しない事を報告している [30]。Cisneros 等の論文 [25] では、単独の sensory rhodopsin II の F-D 曲線と、二本の膜貫通ヘリックスを持つトランスデューサーと会合している sensory rhodopsin II の F-D 曲線が比較されている。しかし、F-D 曲線の形状は、トランスデューサーの会合によって大きく変化する事はないようである。

(III) 標的膜タンパク質を構成する膜貫通 α ヘリックス間の特異的な相互作用は、障壁位置を支配する相互作用ではなさそうである。この事は、Oesterhelt 等の実験的報告 [9] によって説明される。彼らは、以下の二種類の場合について F-D 曲線を計測した。一方は、bR を C 末端側から強制的にアンフォールディングさせる場合である。この場合、bR はヘリックス G&F、E&D、C&B、そして、A の順序でアンフォールドする。つまり、ヘリックス G&F は、アンフォールディングの最初の過程で、脂質膜から引き出される。もう一方は、最初に bR の EF ループを消化によって切断し、その後、E ヘリックスの C 末端側を引っ張って、bR をアンフォールドさせる場合である。この場合、bR はヘリックス E&D、C&B、そして、A の順序でアンフォールドし、ヘリックス G&F は脂質膜中に残存し続ける。しかし、二つの場合の間で、F-D 曲線のうちのヘリックス C&B 及び A の部分のアンフォールディングに対応する部分は、ほとんど同一の形状を示している。この事から、ヘリックス G&F とそれ以外のヘリックスの間の相互作用は、障壁位置に関与しないと考えられる。同様の現象は、ナトリウムイオン/水素イオン-アンチポーターを用いた実験 [28] で特に顕著に示されている。

障壁位置の決定に関与する相互作用

筆者は、前セクションの内容と、先行研究の結果を合わせて考察し、次の考えに至った。それは、障壁位置を支配し得る相互作用として、次の二種類の相互作用が考えられるという事である。それは、アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性、及び、脂質膜中に存在する膜貫通 α ヘリックス内部の水素結合である。その理由は、以下の通りである。

前セクションの内容から、障壁位置を支配し得る相互作用から除外されないものとして、以下の5つが浮かび上がった。

- (i) ポリペプチド鎖と水との間の相互作用。
- (ii) ポリペプチド鎖と脂質分子との間の相互作用。

(iii) 膜タンパク質間の非特異的な相互作用。

(iv) ヘリックス間の非特異的な相互作用。

(v) 脂質膜中での主鎖間の水素結合の相互作用。

これらの相互作用のうち、(i)~(iv) は、'アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性' という一つの相互作用に、次のようにして纏める事ができる。まず、(iii) 及び (iv) の相互作用は、その定義によって、(ii) と同一視して良い。また、(i) 及び (ii) の相互作用を個別に考慮する事は、水と脂質膜の界面において (i) と (ii) の差を考慮する事と等価である。それは以下の理由による。(i) の大きさは、ポリペプチド鎖の水領域内部の移動によって変化しないと考えられる。それ故、その様な移動の範囲では、(i) はポリペプチド鎖に力を及ぼしていないように見える。また (ii) の大きさは、ポリペプチド鎖の脂質膜領域内部の移動によって変化しないと考えられる。それ故、その移動の範囲では、(ii) はポリペプチド鎖に力を及ぼしていないように見える。しかし、ポリペプチド鎖が水領域と脂質膜領域の間を横断して移動するときには、(i) と (ii) の相互作用の差がポリペプチド鎖に働く力として顕在化する。つまり、(i) 及び (ii) の相互作用を個別に考慮する事は、水と脂質膜の界面において (i) と (ii) の差を考慮する事と等しい。本論文では、ポリペプチド鎖はアミノ酸残基から構成されている事を考慮し、(i) と (ii) の差として現れる相互作用を、'アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性' という言葉を用いて表す。一般的に、疎水性の側鎖を持つアミノ酸残基の脂質膜に対する親和性は高く、親水性の側鎖を持つアミノ酸残基の脂質膜に対する親和性は低いと考えてよい。

加えて、筆者は、(v) の内で、 α ヘリックス構造の形成に関与しない水素結合は、障壁位置を支配し得る相互作用に含まれないと考えた。それは、以下の理由による。Kappel 等は、bR の強制アンフォールディングの全原子シミュレーションを行った [34]。彼らの結果では、bR のうち未だ膜中に残ってアンフォールドしていない部分は、天然構造とほぼ同一の構造を維持している。また、脂質膜中でアンフォールディングした部分は完全に引き延された構造をしている。同様の事は Seeber 等のシミュレーション結果 [32] でも示されている。これらの結果は、脂質膜中ではポリペプチド主鎖間に、 α ヘリックス構造の形成に関与する水素結合しか存在しない事を示している。形成される事のない水素結合は、障壁位置を支配し得る相互作用に含まれないと考えられる。

以上の結果を纏めると、障壁位置を支配し得る相互作用として、アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性、及び、脂質膜中に存在する α ヘリックス内部の水素結合が想定できる。筆者は、先行研究を調査したが、これらの相互作用が障壁位置を支配し得る相互作用に含まれないとい

う積極的な根拠を見出せなかった。

当然ながら、以上で言及した相互作用以外にも、様々な相互作用が存在する。それらの影響については、ディスプレイの項目で議論する。

平衡状態への注目

筆者は、エネルギー障壁を形成している相互作用は、平衡状態において膜タンパク質を安定化させている相互作用に含まれていると推測した。その理由は、以下の通りである。

強制アンフォールディングは、非平衡を伴う現象である。しかし、実験における膜タンパク質全体の引き抜き時間は、短くとも 10ms 以上である [12]。そして、障壁を乗り越える直前から障壁の頂点に至るまでの滞在時間を、仮に、10ms の 1/100 として見積ると、100 μ s となる。この時間スケールでは、分子の運動、また、側鎖や脂質分子の局所的な非平衡状態は、常に十分に緩和されていそうである。つまり、障壁を乗り越える部分での系の状態変化は、準平衡状態と見なせそうである。もしそうならば、障壁形成に関与する相互作用は、平衡状態において膜タンパク質の安定性を記述する相互作用に含まれている、または、その延長として理解できるだろう。

マテリアル&メソッド

ここでは、本研究で用いたシミュレーション手法について簡潔に記述する。本研究で用いるシミュレーション手法は、膜貫通ヘリックスの形成過程のシミュレーションを行った幾つかの先行研究 [37, 38, 39, 40, 41] において用いられた手法を、部分的に参考にして開発した。ポリペプチド鎖の粗視化モデル、及び、系の相互作用ポテンシャルの表現方法の詳細は S1 に記述した。相互作用ポテンシャル中の定数値の決定方法の詳細は S2 に記述した。

本研究では、全原子モデルによるシミュレーション手法を採用しなかった。その理由は、膜タンパク質の引き抜きは非常に低速度であり、実験で計測される F-D 曲線を再現する事は、計算量の観点から困難であったからである。しかし、独自のシミュレーション系を開発し、使用したのは、そのような消極的な理由だけではない。独自のシミュレーション系を用いる事によって、現象に関する仮説を明瞭に判定する事ができるようになるからである。

ポリペプチド鎖の粗視化モデル

本研究では、ポリペプチド鎖を表現する為に、ペプチド結合粒子と名付けた粒子を多数直鎖状に繋げた粗視化モデルを用いた。この粗視化モデルは、原子間の結合長及び結合角が固定されているような原子モデルのポリグリシン鎖と、ほぼ同等の機能を持つ。

まず、主鎖中の一つのペプチド結合 (CONH)、及び、それに結合している二つの C α 原子から成る部分 (C α -CONH-C α) を、一つの剛体粒子と考える。以下では、この剛体粒子を”ペプチド結合粒子”又は単に”粒子”と呼ぶ。次に、この粒子に固定された座標系 ($\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}$) (以下では局所座標系と呼ぶ) 上に、以下の 8 つの点、C α^n , C, O, N, H, C α^c そして、hbo, hbh を配置した (図 3)。前者 6 点は、C α -CONH-C α の部分に含まれる各原子に対応する。それらの相対的配置は、一般的なポリペプチド主鎖中の原子配置 [42] に対応するように定めた。後者の 2 点は、主鎖間の水素結合を表現する為の結合点である (後述)。局所座標系における各点の座標 (表 1) を表す列ベクトルを、先に示した点の順に、 $\hat{r}^{\alpha^c}, \hat{r}^C, \hat{r}^O, \hat{r}^N, \hat{r}^H, \hat{r}^{\alpha^n}, \hat{r}^{hbo}, \hat{r}^{hbh}$, で表す。

本研究では、N, C 末端もまた、それぞれ一つのペプチド結合粒子とした。そして、ポリペプチド主鎖を、N+1 個の粒子を直鎖状に連結させたものとして表現する。N 末端の粒子の番号を 0 とし、C 末端に向かう順に連番とした。C 末端の粒子の番号は、N となる。

シミュレーションを行う空間の座標系 (x, y, z) (以下では大域座標系と呼ぶ) の x, y, z 軸の単位ベクトルを、それぞれ、 $\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}$ とする。大域座標系における粒子 i の座標は、位置と向きで指定される。粒子 i の位置は、その局所座標系の原点の位置 \mathbf{r}_i で表す。また、粒子 i の向きは、その局所座標系の座標軸の単位ベクトルから作られる 3×3 行列 \mathbf{A}_i で表す。

シミュレーション系の状態 \mathbf{q} は、全粒子の位置と向き及びカンチレバーの根元の座標 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ (後述) を用いて、次式で表す。

$$\mathbf{q} = \{\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{A}_0, \mathbf{A}_1, \dots, \mathbf{A}_N, \mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}\} \quad (1)$$

粒子内部に定義した 8 つの点の大域座標は、その局所座標、及び、粒子の位置と向きから、座標変換によって算出される。例として、位置 \mathbf{r} 、向き \mathbf{A} にある粒子上に固定された点 P について考える。点 P の局所座標は $\hat{\mathbf{r}}^P = (\hat{x}^P, \hat{y}^P, \hat{z}^P)^T$ であるとする。すると、点 P の大域座標 $\mathbf{r}^P = (x^P, y^P, z^P)^T$ は、次式で算出される。

$$\mathbf{r}^P = \mathbf{A}\hat{\mathbf{r}}^P + \mathbf{r} \quad (2)$$

同様にして、位置 \mathbf{r}_i 、向き \mathbf{A}_i にある粒子 i に含まれる 8 つの点 C α^c , C, O, N, H, C α^n , hbo, hbh の大域座標、そ

れぞれ、 $r_i^{\alpha c}$, r_i^C , r_i^O , r_{i+1}^N , r_{i+1}^H , $r_{i+1}^{\alpha n}$, r_i^{hbo} , r_{i+1}^{hbh} が算出される。これらの座標から、更に、 r_i^α , θ_i , ϕ_i , 及び、 ψ_i を算出する。ここで、 r_i^α は、 i 番目の C^α 原子に対応する点の座標であり、 $r_i^{\alpha n}$ と $r_i^{\alpha c}$ の中点と定義する。 θ_i は、 i 番目のアミノ酸の原子間結合角 $\angle NC^\alpha C$ である。 ϕ_i 及び ψ_i は、 i 番目の C^α 原子を含む、主鎖の二面角である。

相互作用ポテンシャル

系全体の相互作用ポテンシャル U^{sys} は、次式で表した。

$$U^{\text{sys}} = U^{\text{pep}} + U^{\text{mem}} + U^{\text{hb}} + U^{\text{cl}} + U^{\text{wall}} \quad (4)$$

ここで、 U^{pep} は、多数のペプチド結合粒子を連結し、現実のポリペプチド鎖の様に振る舞わせるためのポテンシャル項である。 U^{mem} は、ポリペプチド鎖の脂質膜に対する親和性を表すポテンシャル項である。 U^{hb} は主鎖間の水素結合の引力的部分を表現するポテンシャル項である。 U^{cl} はカンチレバーのたわみエネルギーを表すポテンシャル項である。 U^{wall} は、特定の領域へのポリペプチド鎖の侵入を制限するポテンシャル項である。それぞれのポテンシャル項の詳細は、以下に記述する。

U^{pep} は、多数の粒子が連結してポリペプチド主鎖を形成し、現実のポリペプチド鎖の様に振る舞う為のポテンシャル項であり、次式で表される。

$$U^{\text{pep}} = U^b + U^a + U^{\text{da}} + U^{\text{rep}} \quad (4)$$

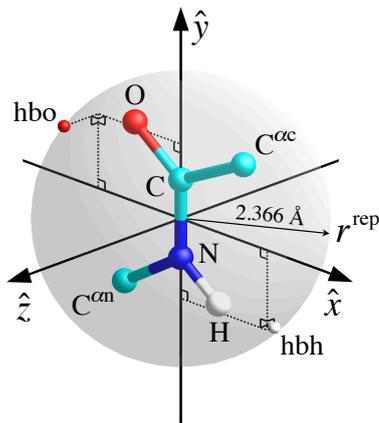


図 3: ペプチド結合粒子の構造。本研究では、この粒子を多数連結させたものを用いて、ポリペプチド主鎖を表現する。 \hat{x} , \hat{y} , \hat{z} は粒子に固定された座標系の座標軸を表す。 $C^{\alpha c}$, C , O , N , H , $C^{\alpha n}$, hbo , hbh は、この座標系上に配置された点を表す。それらの座標は表 1 に記述した。前者の 6 点は主鎖のペプチド結合に含まれる原子と、それを挟む二つの C^α 原子に対応する。灰色の球殻は、粒子の接触半径を表す。 hbo 点と hbh 点は、この球殻上に配置されており、主鎖内部の水素結合を表現するため使用される。 hbo 及び hbh 点の座標は、ポリペプチド鎖が $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$ の右巻き α ヘリックス構造を形成するとき、それぞれ、他の粒子の hbh 及び hbo 結合点と一致するように定めた (詳細は S2 を見よ)。

U^b は U_i^b の総和である。 U_i^b は、 $r_i^{\alpha n}$ と $r_i^{\alpha c}$ の座標が常に殆ど一致している状態を保つ為のポテンシャル項であり、次式で表現した。

$$U_i^b = \frac{k^b}{2} (r_i^{\alpha c} - r_i^{\alpha n})^2 \quad (5)$$

ここで、 $k^b = 125.02 \text{ J/m}^2$ を使用した。

U^a は、 U_i^a の総和である。 U_i^a は、 C_i^α 原子周りの結合角 $\angle N_i C_i^\alpha C_i$ の結合角 θ_i を拘束するポテンシャル項であり、次式で表現した。

$$U_i^a = \frac{k^a}{2} (\theta_i - 110.1^\circ)^2 \quad (6)$$

ここで、 $k^a = 4.618 \times 10^{-22} \text{ J/deg}^2$ を使用した。

U^{da} は、 U_i^{da} の総和である。 U_i^{da} は、プロリン残基の N 端側の二面角 ϕ_i に関するポテンシャル項である。 U_i^{da} は、 i 番目のアミノ酸がプロリンである場合にのみ、以下で表現した。

$$U_i^{\text{da}} = \frac{k_\phi^{\text{Pro}}}{2} (\phi_i + 65.4^\circ)^2 \quad (7)$$

ここで、 $k_\phi^{\text{Pro}} = 3.281 \times 10^{-23} \text{ J/deg}^2$ を使用した。

U^{rep} は、 $U_{i,j}^{\text{rep}}$ の総和である。 $U_{i,j}^{\text{rep}}$ は、粒子 i, j 間の重なりを制限するポテンシャル項である。 $U_{i,j}^{\text{rep}}$ は、 $|j-i| \neq 0, 1, 2$ かつ $|r_j - r_i| < 2r^{\text{rep}}$ の時に、

$$U_{i,j}^{\text{rep}} = \frac{k^{\text{rep}}}{2} (2r^{\text{rep}} - |r_j - r_i|)^2 \quad (8)$$

と表現した。それ以外のときでは、 $U_{i,j}^{\text{rep}} = 0$ とした。ここで、 $r^{\text{rep}} = 0.2366 \text{ nm}$ 及び $k^{\text{rep}} = 100 \text{ N/m}$ を使用した。

U^{mem} は、ポリペプチド鎖の脂質膜に対する親和性を表すポテンシャル項である。本研究では、脂質膜を連続体と想定し、残基の膜に対する親和性を、陰溶媒モデルによって表現した。具体的には、次の事を行った。まず、現実のポリペプチド鎖を、主鎖単位 ($0.5C^\alpha$ -CONH- $0.5C^\alpha$)、N 末端、C 末端、側鎖という分子断片に区分する。次に、各分子断片の、粗視化モデル上で対応する部分を考える。そして、対応する部分を代表する座標を用いて、分子断片と膜との相互作用ポテンシャルを記述する。脂質膜は、その中面が xy 平面と重なるように空間中に配置した。

例として、とある分子断片の場合について説明する。断片の脂質膜に対する親和性を表すポテンシャル項 U を、次式で表現する。

$$U = \Delta U \cdot g(z) \quad (9)$$

ここで、 ΔU は、断片を完全な水溶媒環境中から完全な脂質膜内環境中へ輸送するときに伴う自由エネルギー変

化である。また、 $g(z)$ は、ポリペプチド鎖の粗視化モデル上で断片に対応する部分を代表する点の z 座標の関数である。 $g(z)$ は、脂質コア領域 ($|z| < 1.4\text{nm}$) で 1、水領域 ($2.1\text{nm} \leq |z|$) で 0 をとり、膜界面で 0 から 1 の間を滑らかに変化する。 $g(z)$ の概形は、図 4 に示した。各々の分子断片の相互作用ポテンシャル ΔU の値は、平衡状態における親和性を表現するものであるべきである。本研究は、これらの値として、Roseman がオクタノール-水分係数を用いて導出した値 [43] を部分的に修正し、使用した。

U^{mem} は、具体的には、 U^{mc} と U^{sc} の和である。 U^{mc} は、単位主鎖または N,C 末端の断片の親和性を表すポテンシャル項 U_i^{mc} の総和である。 U_i^{mc} は、粒子 i の中心の z 軸座標 z_i を用いて $U_i^{\text{mc}} = \Delta U_i^{\text{mc}} \cdot g(z_i)$ と表現した。ここで、 $\Delta U_0^{\text{mc}} = \Delta U^{\text{Nterm}}$ 、 $\Delta U_N^{\text{mc}} = \Delta U^{\text{Cterm}}$ 、それ以外では $\Delta U_i^{\text{mc}} = \Delta U^{\text{pb}}$ を用いた。 ΔU^{Nterm} 、 ΔU^{Cterm} 、及び、 ΔU^{pb} の値は、表 2 に示した。 U^{sc} は、側鎖断片のポテンシャル項 U_i^{sc} の総和である。 U_i^{sc} は、 C_i^α 原子の z 座標 z_i^α 及び側鎖の種類によって異なる定数、 ΔU_i^{sc} 、を用いて $U_i^{\text{sc}} = \Delta U_i^{\text{sc}} \cdot g(z_i^\alpha)$ と記述した。 ΔU_i^{sc} の具体的な値は、表 2 に示した。

U^{hb} は主鎖間の水素結合の引力的部分を表現するポテンシャル項である。本研究では、ポリペプチド鎖が α ヘリックス構造を形成する為に必要な水素結合、つまり、 O_i と H_{i+4} の間の水素結合 (以下では i 番目の水素結合と呼ぶ) のみを考慮した。水素結合の引力的部分を表現する為に、粒子上に hbo 点 (酸素原子側の水素結合点) 及び hbh 点 (水素原子側の水素結合点) という二種類の結合点を配置した。粒子 i 上において、 O_i 原子点近傍に配置された hbo 点を hbo_i とし、 H_{i+4} 原子点近傍に配置さ

表 1: ペプチド結合粒子に固定した座標系 (局所座標系) 上に配置した 8 点、 $C^{\alpha c}$, C, O, N, H, $C^{\alpha n}$, hbo, hbh の座標

Point	\hat{x} [pm]	\hat{y} [pm]	\hat{z} [pm]
$C^{\alpha c}$	139.8	128.2	0.0
C	0.0	66.0	0.0
O	-101.6	137.1	0.0
N	0.0	-66.0	0.0
H	83.9	-120.5	0.0
$C^{\alpha n}$	-123.3	-146.1	0.0
hbo	-180.6	130.3	79.6
hbh	189.1	-141.9	-7.6

\hat{x} , \hat{y} , \hat{z} は局所座標系の座標軸を表す。前者の 6 点は主鎖のペプチド結合に含まれる原子に対応する。それらの原子間の相対的配置は、文献 [42] の値を使用した。hbo 及び hbh の 2 点は、それぞれ、酸素側及び水素側の水素結合点を表す。

れた hbh 点を hbh_{i+1} と記述する。 hbo_i 及び hbh_{i+1} の大域座標を、それぞれ、 r_i^{hbo} 及び r_{i+1}^{hbh} とする。粒子上に配置した hbo 点及び hbh 点の局所座標、それぞれ、 r^{hbo} 、 r^{hbh} は、次の条件を満たすように定めた。それは、ポリペプチド鎖が $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$ の右巻き α ヘリックス構造を形成するときに、 r_i^{hbo} 及び r_{i+4}^{hbh} が、 r_i と r_{i+3} の中点の座標上で重なるという条件である。

U^{hb} は、 i 番目の水素結合を表現するポテンシャル項 U_i^{hb} の総和である。 U_i^{hb} は、 r_i^{hbo} 及び r_{i+4}^{hbh} の関数である。これら二点が一致したとき、 U_i^{hb} の値は、水中では小さく、膜中では大きく低下するように、ポテンシャルを設定した。具体的に、 U_i^{hb} は、次式で表現した。

$$U_i^{\text{hb}} = \{(\Delta U^{\text{hb,m}} - \Delta U^{\text{hb,w}}) \cdot g(z_i^{\text{hb}}) + \Delta U^{\text{hb,w}}\} \cdot h(r_i^{\text{hb}}) \quad (10)$$

ただし、プロリン主鎖の N 原子は水素結合に参加できないので、 $i+4$ 番目の残基がプロリンである場合は、 $U_i^{\text{hb}} = 0$ とした。ここで、 z_i^{hb} は r_i^{hbo} と r_{i+4}^{hbh} の中点の z 座標を表し、 r_i^{hb} は r_i^{hbo} と r_{i+4}^{hbh} の間の距離を表す。 $g(z)$ は、式 9 に使用したものと同一である。 $\Delta U^{\text{hb,w}} = -8.726\text{kJ/mol}$ 、 $\Delta U^{\text{hb,m}} = -24.93\text{kJ/mol}$ は、それぞれ、水中、脂質膜中の水素結合ポテンシャルの最小値を表す。 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値は、主鎖の単位とほぼ同一の構造を持つ N-メチルアセトアミド分子の水中での二量体形成に伴う自由エネルギー変化 [44] より算出した。 $\Delta U^{\text{hb,m}}$ は、予備的なシミュレーションにより決定した。この事については、マテリアル&メソッド内の「シミュレーション系の検証」のセクションに記載した。

関数 $h(r)$ は、 $r < r_0^{\text{hb}}$ の時に次式で表される。

$$h(r) = -3(r/r_0^{\text{hb}})^4 + 8(r/r_0^{\text{hb}})^3 - 6(r/r_0^{\text{hb}})^2 + 1 \quad (11)$$

それ以外のときは、 $h(r) = 0$ とする。ここで、 $r_0^{\text{hb}} = 0.25\text{nm}$ を使用した。

U^{cl} はカンチレバーの弾性エネルギーを表すポテンシャル項である。カンチレバーの根元の座標を $r_{\text{base}}^{\text{cl}}$ 、針先の座標を $r_{\text{head}}^{\text{cl}}$ で表す (図 4 を見よ)。 $r_{\text{bh}}^{\text{cl}} = r_{\text{head}}^{\text{cl}} - r_{\text{base}}^{\text{cl}}$ と定義し、また、 $r_{\text{bh}}^{\text{cl}}$ の x, y, z 成分を $x_{\text{bh}}^{\text{cl}}, y_{\text{bh}}^{\text{cl}}, z_{\text{bh}}^{\text{cl}}$ と定義する。bR を N 末端ループから引き抜く場合は、 $r_{\text{head}}^{\text{cl}} = r_0$ とし、また、C 末端ループからの場合は $r_{\text{head}}^{\text{cl}} = r_N$ とする。そして、 U^{cl} を次式で表現した。

$$U^{\text{cl}} = \frac{1}{2}k_x^{\text{cl}}(x_{\text{bh}}^{\text{cl}})^2 + \frac{1}{2}k_y^{\text{cl}}(y_{\text{bh}}^{\text{cl}})^2 + \frac{1}{2}k_z^{\text{cl}}(z_{\text{bh}}^{\text{cl}})^2 \quad (12)$$

ここで、 $k_z^{\text{cl}} = 0.1\text{N/m}$ は、実験に用いられる一般的なカンチレバーのバネ定数 [9] とした。また、 $k_x^{\text{cl}} = k_y^{\text{cl}} = 50.0\text{N/m}$ を使用した。カンチレバーに働く z 軸方向の力は、 $F_z^{\text{cl}} = k_z^{\text{cl}}z_{\text{bh}}^{\text{cl}}$ となる。

U_i^{wall} は、特定の領域へのポリペプチド鎖の侵入を制限するポテンシャル項であり、 U_i^{wall} の総和である。 U_i^{wall} は、粒子 i が領域 D (図4の灰色の領域) に侵入する事を制限するポテンシャル項であり、次のように記述した。先ず、 D の内部で最も r_i に近い点の座標を r_i^d とする。そして、 U_i^{wall} を、 $|r_i - r_i^d| < r^{\text{wall}}$ である時に、

$$U_i^{\text{wall}} = \frac{k^{\text{wall}}}{2} (r^{\text{wall}} - |r_i - r_i^d|)^2 \quad (13)$$

それ以外では、 $U_i^{\text{wall}} = 0$ と表現した。ここで、 $k^{\text{wall}} = 100.0\text{N/m}$ 、及び、 $r^{\text{wall}} = 0.2366\text{nm}$ を使用した。 U^{wall} により、領域 D の表面は、粒子に対して壁のように振る舞う。

シミュレーションの手法と条件

シミュレーション系の時間発展には、ブラウン動力学法 [45] を用いた。ブラウン動力学法は、本研究で用いた脂質膜と水の陰溶媒モデルに適するからである。時間発展は以下の手順 (i)~(v) を繰り返す事により計算した。

- (i) 時刻 t での粒子の位置 $r_i(t)$ と向き $A_i(t)$ から、粒子上に配置された原子と水素結合点の、大域座標を計算し、また、 θ_i 、 ϕ_i 及び ψ_i を算出する。
- (ii) それらの座標と U^{sys} から、粒子に働く力 $F_i(t)$ とトルク $T_i(t)$ を計算する (詳細は S3 を見よ)。

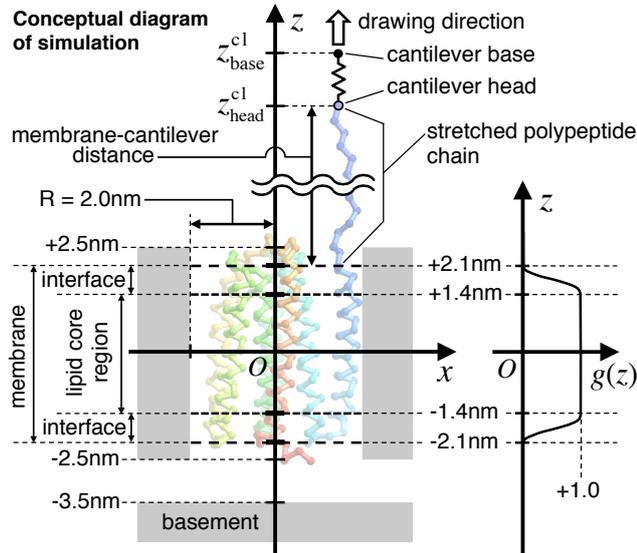


図4: バクテリオロドプシンの強制アンフォールディングシミュレーションの概念図。系の xz 平面における断面図を示した。脂質膜は、膜の中間が xy 平面に一致する様に配置された。灰色の領域は、ペプチド結合粒子の侵入が制限されている領域を示す。このうち、 $-2.5\text{nm} \leq z \leq +2.5\text{nm}$ かつ $2.0\text{nm} \leq \sqrt{x^2 + y^2}$ を満たす領域は、膜貫通ヘリックスの脂質膜内での拡散を防ぐ為に設定された。 $z \leq -3.5\text{nm}$ の領域は、AFMの基板を表現する為に設定された。図中右は、関数 $g(z)$ の概形である。縦軸は z 軸、横軸は $g(z)$ の値を表す。

- (iii) ブラウン動力学法に基づいて、 $r_i(t)$ と $A_i(t)$ から、 $r_i(t + \Delta t)$ と $A_i(t + \Delta t)$ を計算する (詳細は S4 を見よ)。
- (iv) カンチレバーの針先と膜表面間の距離及び、そのときカンチレバーがポリペプチド鎖に及ぼす力を記録する。
- (v) カンチレバーの根元の座標を z 軸上方へ、 $\Delta t \cdot v^{\text{cl}}$ だけ移動させる。

シミュレーションでは、粒子のストークス半径として 0.4nm 、系の温度として 298K を用いた。溶液の粘性率として水中と脂質膜中で共に水の粘性率 $8.9 \times 10^{-4}\text{Pa} \cdot \text{s}$ を用い (粘性率の設定に問題が無い事の詳細は S9 に記述)、また、時間刻み幅 $\Delta t = 10\text{fs}$ を用いた。この時間刻み幅は、本研究のシミュレーションモデルにおいて妥当な値である (詳細は S5 を見よ)。

bR の初期構造として、1BRR[46] の chain A を使用した。欠けているアミノ酸残基 (1~2aa 及び 233aa~247aa) は、手動で追加した。 bR は、大域座標系の原点付近に、ヘリックスが膜に対して概ね垂直となり、なおかつ、引き抜き方向に応じて N または C 末端が z 軸上方に位置するように配置した (図4)。本研究では、アミノ酸の配列として、1BRR に記述されたアミノ酸配列を使用した。この配列の全長は、247 残基であり、通常の bR のアミノ酸配列に比べて 1 残基短い。本来、AG²⁴¹-DGAAAT-S²⁴⁸ である筈の部分が、AD²⁴¹-GAAAT-S²⁴⁷ となっている。つまり、G²⁴¹ が欠失していることに注意が必要である。実際の bR の K²¹⁶ にはレチナル分子が結合しているが、このレチナルを除去しても力のピーク位置は変化しない [23]。そこで本研究では、このレチナル分子を計算に含めなかった。

強制アンフォールディングのシミュレーションを行う前に、水素結合の引力的部分を表現する相互作用ポテンシャルの脂質膜内での最低値を表す $\Delta U^{\text{hb,m}}$ を、次の方法で決定した (詳細は S6 を見よ)。先ず、脂質膜中に存在している bR の $100\mu\text{s}$ のシミュレーションを、様々な値の $\Delta U^{\text{hb,m}}$ において、実行した。このシミュレーションでは、 $U^{\text{cl}} = 0$ とし、強制アンフォールディングを行わなかった。次に、シミュレーション結果における α ヘリックス構造の形成状況を、STRIDE[47] を使用して調べた。その結果、 $\Delta U^{\text{hb,m}} \leq -24.93\text{kJ/mol}$ であるならば、シミュレーション全体を通して、 bR の 7 本の膜貫通 α ヘリックスが安定に存在できる事が分かった。一般的に、タンパク質の状態は、安定と不安定の境界付近にあると考えられている [48]。そこで、本研究では、 $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の値として、 -24.93kJ/mol ($= -10.0k_B T$),

ノ酸の C α 原子の z 座標を z_i^α とする。次に、 i' を、C 端側の場合では $z_i^\alpha \leq 2.1\text{nm} < z_{i+1}^\alpha$ を満たす最大の i 、N 端側の場合では $z_{i+1}^\alpha \leq 2.1\text{nm} < z_i^\alpha$ を満たす最小の i とする。そして、 $z = 2.1\text{nm}$ の位置にある仮想のアミノ酸番号 i_s を、次式で求める。

$$i_s = i' + \frac{2.1\text{nm} - z_{i'}^\alpha}{z_{i'+1}^\alpha - z_{i'}^\alpha} \quad (15)$$

最終的に、C 端側の場合では $L = 247 - i_s$ 、また、N 端側の場合では $L = i_s - 1$ と定義する。

シミュレーション結果のスケール変換

本研究のシミュレーションは、溶媒の粘性率 $\eta = 8.9 \times 10^{-4} \text{Pa} \cdot \text{s}$ 、時間間隔 $\Delta t = 10\text{fs}$ 、及び、引き抜き速度 $v^{\text{cl}} = 1.0\text{mm/s}$ という条件の下で実行した。一方、実験で一般的に用いられる引き抜き速度は、概ね $v^{\text{cl}} = 1000\text{nm/s}$ であり、本研究で用いた値の方が約 1000 倍大きい。力のピークの大きさ及び出現率は、引き抜き速度に応じて変化する [12]。それ故、シミュレーション結果と実験結果の間でそれらを比較する際には、何らかの不都合を生じるように思える。

しかし、実は、条件 ($\eta_1, \Delta t_1, v_1^{\text{cl}}$) の下で実行したシミュレーションの結果は、以下の二つの条件を満たす異なる

表 2: アミノ酸の側鎖、主鎖、及び末端の脂質膜への親和性を表現する定数

fragment	ΔU [kJ/mol]	force [pN]	fragment	ΔU [kJ/mol]	force [pN]
Ala	-3.5	-17	Phe	-14.3	-68
Arg	+21.0	+100	Pro	-7.0	-33
Asn	+9.6	+46	Ser	+5.8	+28
Asp	+23.9	+113	Thr	+4.5	+21
Cys	-2.7	-13	Trp	-13.4	-63
Gln	+6.2	+29	Tyr	-9.7	-46
Glu	+19.3	+92	Val	-8.7	-41
Gly	-1.3	-6			
His	+2.2	+10	N-terminal	+9.8	+46
Ile	-11.7	-55	C-terminal	+27.1	+129
Leu	-11.7	-55	>CH-CONH-	+12.4	+59
Lys	+11.8	+56			
Met	-6.8	-32	(H bond)	(+2.3)	(+11)

これらの値は、完全な水環境から完全な膜内環境へ、アミノ酸の側鎖、主鎖、及び末端を輸送する為に必要な自由エネルギーに相当する。fragment 列の大文字 3 字はアミノ酸の名称を表す。それに対応する ΔU 列の値は、その側鎖部分の定数 ΔU^{sc} を表す。fragment 列の N-terminal, C-terminal, 及び >CH-CONH- は、それぞれ、N, C 末端及び主鎖の一単位を表す。それに対応する ΔU 列の値は、その部分の定数、それぞれ、 ΔU^{Nterm} , ΔU^{Cterm} , 及び ΔU^{pb} を表す。これらの定数値は、Roseman[43] を参考にして、各断片のオクタノール-水分配係数から導いた。電離する側鎖及び C, N 末端の定数は、水素イオン濃度の影響 ($\text{pH}=7.8$) を考慮した上で算出した。本研究では、bR の N 末端はラクタム化されていると想定した。その為に、E¹ を Q¹ に置換し、 $\Delta U^{\text{Nterm}} = 0.0$ を使用した。各定数の算出方法の詳細は S2 に記述した。

条件 ($\eta_2, \Delta t_2, v_2^{\text{cl}}$) の下で実行したシミュレーションの結果と同一視できる (具体的な証明は S9 を見よ)。

$$\Delta t_1 / \eta_1 = \Delta t_2 / \eta_2 \quad (16)$$

$$v_1^{\text{cl}} \cdot \Delta t_1 = v_2^{\text{cl}} \cdot \Delta t_2 \quad (17)$$

この事は、本研究のシミュレーション結果を、 $\eta = 0.89\text{Pa} \cdot \text{s}$ 、 $\Delta t = 10\text{ps}$ 、及び、 $v^{\text{cl}} = 1000\text{nm/s}$ を用いて実行された結果と見なせる事を意味する。ここに現れる粘性率 $0.89\text{Pa} \cdot \text{s}$ は、脂質膜内の粘性率として概ね妥当な値である。また、時間間隔 10ps は、粘性率 $0.89\text{Pa} \cdot \text{s}$ と引き抜き速度 1000nm/s の下でブラウン動力学法に基づく適切なシミュレーションが行えるような時間間隔である。それ故、筆者は、本研究のシミュレーション結果において観察された力のピークの高さ及び出現率を、他者の実験結果と直接的に比較する事は、妥当であると判断した。

結果

F-D 曲線の解析

本研究では bR の強制アンフォールディング実験の計算機シミュレーションを行った。bR は、C 端側から及び N 端側から、それぞれ 128 回ずつ引き抜かれた。シミュレーションの結果として得られた F-D 曲線のうち、32 本を重ね合わせたものを、図 6 に示した。(C 末端側 図 6(A), N 末端側 図 6(B))。F-D 曲線上には、多数の力のピークが出現した。F-D 曲線に出現した力のピークの位置と大きさ並びに出現頻度は、以下の手順で解析した。解析は、C 末端側からの引き抜き、及び、N 末端側からの引き抜きについて、それぞれ個別に行った。

まず、筆者は、全 F-D 曲線に出現した力のピークを目視で判断し、選出した。その結果、C 末端側で 918 個、N 末端側で 1420 個のピークが選出された。S10 に、C 末端側、N 末端側において観察された F-D 曲線から、それぞれ代表的な 6 本を選び、選出した力のピークの位置と共に示した。

筆者は、それぞれの力のピークについて、それを特徴づける以下の三つの値を調べた。(i) 力のピークの大きさ、即ち、力の大きさの最大値。(ii) 力のピークの距離、即ち、力の大きさが最大となった時点での膜表面とカンチレバーの針先間の距離。(iii) 力のピークの位置、即ち、力の大きさが最大となった時点での架橋鎖の残基長。

続いて、全てのピークを、位置と高さに対してプロットした (図 6 (C), (D))。どちらの側でも、点は複数の集

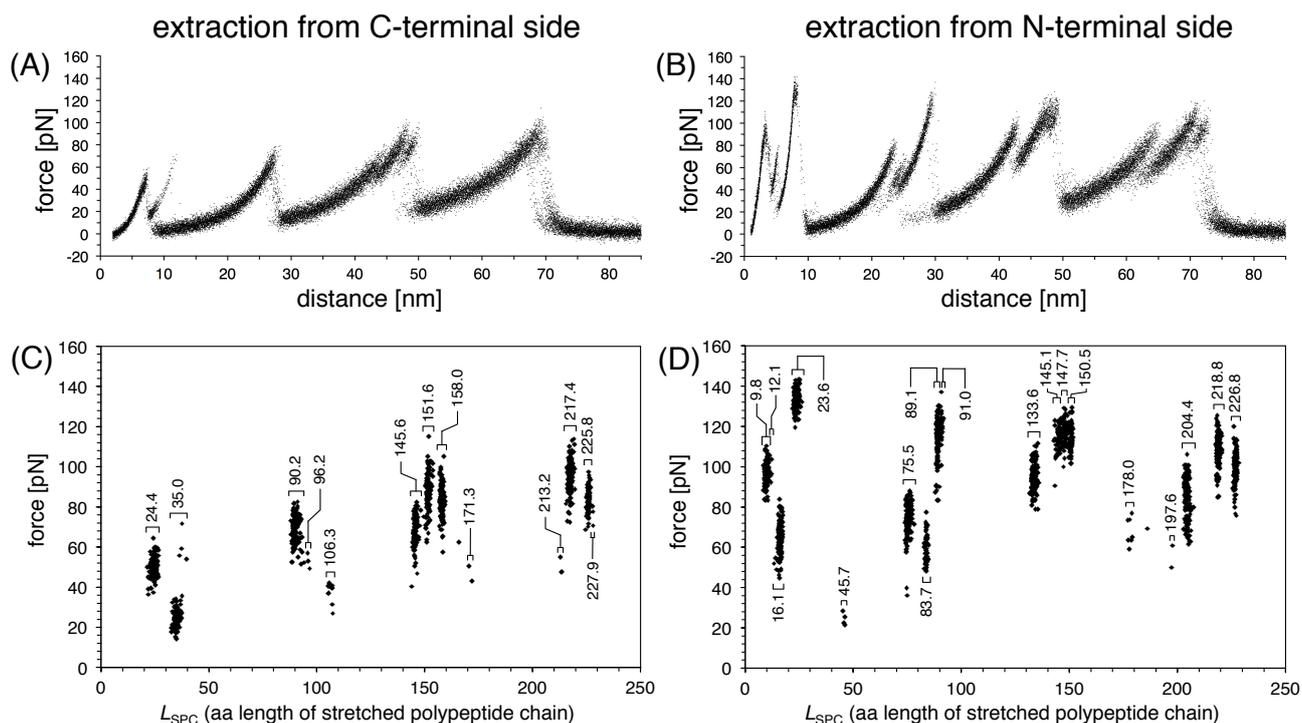


図 6: (A,B) バクテリオロドプシンの強制アンフォールディングシミュレーションの結果として得られた F-D 曲線のうちの 32 本を重ね合わせて示したもの。C 末端側からの引き抜き (A) 及び N 末端側からの引き抜き (B)。横軸は膜表面とカンチレバーの針先間の距離を表す。縦軸は膜表面とカンチレバーの針先を繋ぐ架橋ポリペプチド鎖を通して両者の間に働く引力の大きさを表す。一つの F-D 曲線は 10000 個のデータを持つが、ここでは 10 ステップごとに平均を取って 1000 点のデータに減少させ、表示した。C 端側、N 端側共に、4 つの大きなピークが出現している。F-D 曲線の全体の形状は、実験結果と良く似ているように見える。(C,D) 128 本の F-D 曲線から抽出された全ての力のピークの間をプロットしたもの。横軸は、ピーク出現時の架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基数を表す。縦軸は、ピーク出現時の膜とカンチレバーの間に働く引力の大きさを表す。C 末端側からの引き抜き (C) 及び N 末端側からの引き抜き (D)。点は、複数箇所に密集していた。それらは、C 及び N 端側で、それぞれ 13 及び 18 個の集団に分かれていた (S11 を見よ)。各グループに含まれるピークの架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基数の平均値を、点の密集した場所で表される個別の集団の上部に記した。

団に分かれているように見える。筆者は、目視で検出したピークについて、そのピーク位置に対して小さい順に並べ替えた。その結果、C 端側のピークは 13 個の集団に、また、N 端側のピークは 18 個の集団に分けられた (詳細は S11 を見よ)。

加えて、各ピーク集団に対し、集団内でのピークの位置、ピークの高さ、膜表面-カンチレバー間距離について、平均値と標準偏差を計算した。また、各集団のピークの個数を調べた (詳細は S12 を見よ)。

筆者は、取りあえず、同一の集団に含まれるピークは全て、同一の障壁によって出現したと想定した。そして、集団のピーク位置の平均値を、対応するエネルギー障壁の識別子として用いた (図 6 (C),(D) 中に示した)。

ポリペプチド鎖長の頻度のピーク位置

上記の解析手段 (以下では通常の解析手段と表す) は筆者の目視による判断を含む。それ故、最終的に算出される障壁位置に、筆者の主観の混入の可能性を残す。この可能性は、以下の方法で排除できる。それは、筆者の主観の混入が殆どないと考えられる補助的な解析手段に

よって障壁位置を算出し、通常の解析手段の結果と比較する事である。両者の結果が十分に一致すれば、通常の解析手段の結果は信頼できるものになる。

本研究では、補助的な解析手段として、次の手法を用いた。それは、全シミュレーションの全フレームにおける架橋鎖の残基長を算出し、残基長の頻度分布のグラフを作成するという方法である。エネルギー障壁に出くわすとポリペプチド鎖の抽出は一旦停止し、その障壁を乗り越えるまで架橋鎖は殆ど同じ残基長を維持する。それ故、グラフ中に現れる分布のピークは、エネルギー障壁の位置に対応していると見なせる。この解析手段には、通常の解析手段では検出しづらいエネルギー障壁の存在を検出できるという利点もある。解析方法と結果の詳細は、S12 に示した。

図 7 において、通常の解析手段と補助的な解析手段の間で、エネルギー障壁の位置及び出現頻度を比較した。その結果、通常の解析手段による障壁位置は、補助的な解析手段による障壁位置にほぼ全て含まれていた。この事は、F-D 曲線上に出現した力のピークの特定、及び、そのピーク位置の測定に、筆者の主観の混入が殆どなかった事を意味する。また、補助的な解析手段の結果が

ら、通常の解析手段によって検出できなかった幾つかのエネルギー障壁の存在が明らかとなった。

実験では、力のピーク位置を、WLC フィッティングによって評価する。WLC フィッティングは、F-D 曲線上において力の大きい部分を中心に行われる。つまり、架橋鎖が十分に引き延ばされている状態のみが、力のピーク位置の評価に使用されている。この意味では、実験的に用いられた力のピーク位置の解析方法は、本研究の補助的な解析手段よりも、本研究の通常の解析手段に似ている。それ故、以下では専ら通常の解析手段の結果を、実験的論文で報告されたエネルギー障壁位置との比較の為に使用する。

エネルギー障壁位置の比較

図7において、シミュレーション結果におけるエネルギー障壁の位置と力のピークの出現頻度を、先行研究のそれらと比較した。C 末端側からの引き抜きでは、Sapra 等 [20]、Kessler 等 [21]、及び、Voitchovsky 等 [31] に記載された結果を用いた。N 末端側からの引き抜きでは、Kessler 等 [21]、Voitchovsky 等 [31] に記載された結果を用いた。架橋鎖の残基長の定義は、それぞれの論文及び本研究のシミュレーション結果の間で、少しずつ異なっている。それ故、障壁位置の評価の基準もまた、それぞれの間で少しずつ異なっている。そこで、筆者は、それらの障壁位置を絶対的な評価基準に基づいて換算した(詳細は S14 を見よ)。図7では、換算後の障壁位置が使用されている。

以下では、障壁位置の比較結果を記述する。力のピークの出現率の比較は、ディスカッションの項目に記述する。

筆者は、両者の一致の程度を数量的に評価する為に(詳細は S15 を見よ)、「一致数」を次のように定義した。先ず、実験結果のとある障壁位置を L とする。次に、 $L \pm 3aa$ の範囲に、シミュレーション結果の障壁位置が一つ以上存在するとき、実験結果の障壁位置 L はシミュレーション結果の中に一致する障壁位置を持つと定義する。 $\pm 3aa$ とは、実験結果における障壁位置の誤差の範囲 [21] である。最終的に、シミュレーション結果の中に一致する障壁位置を持つ実験結果の障壁位置の数を、実験結果のシミュレーション結果に対する障壁位置の「一致数」と定義する。(実験結果の一致数)/(実験結果の全障壁数)は、C 末端側においては、Sapra 等の結果では 8/11、Kessler 等では 8/13、そして、Voitchovsky 等では 7/17 となった。また、それらは、N 末端側においては、Kessler 等では 7/13、Voitchovsky 等では 6/14 となった。

加えて、筆者は、シミュレーション結果の障壁位置が実験結果の障壁位置と偶然に一致する可能性を、次のよ

うに評価した(詳細は S15 を見よ)。先ず、1aa~247aa の範囲で、シミュレーション結果の障壁位置と同数(即ち、C 末端側 13 個、N 末端側 18 個)の障壁位置を無作為に選ぶという試行を考える。次に、一回の試行において、実験結果の無作為なデータに対する一致数が、シミュレーション結果に対する一致数と等しくなるか、それを上回る確率 p を計算する。その結果、C 末端側においては、Sapra 等の実験結果の場合では $p = 0.00043$ 、Kessler 等の場合では $p = 0.0043$ 、そして、Voitchovsky 等の場合では $p = 0.087$ となった。また、N 末端側においては、Kessler 等の場合では $p = 0.15$ 、そして、Voitchovsky 等の場合では $p = 0.37$ となった。

C 末端側では、一致数の観点からみると、シミュレーション結果は、Sapra 及び Kessler 等の結果と良く一致している。Sapra 等の結果の Kessler 等の結果に対する一致数は、9 個である。つまり、シミュレーションと Sapra 等の間の障壁位置の一致の程度は、Sapra 等と Kessler 等の間の一致の程度とほぼ等しい。また、シミュレーション結果が Sapra 等及び Kessler 等の結果と偶然に一致した可能性は十分に小さい事が分かった。シミュレーション結果と Voitchovsky 等の結果との間には、良い一致は見出せなかった。

N 末端側では、シミュレーション結果中の 75.5~91.0aa 及び 133.6~150.5aa の範囲の障壁位置は、Kessler 等の結果と一致しているように見える。Kessler 等の論文では 0~60aa 付近の力のピークは解析されていないので、比較はできなかった。シミュレーション結果中の 178.0~226.8aa の範囲の障壁位置は、Kessler 等の結果とあまり一致していなかった。シミュレーション結果と Voitchovsky 等の結果との間には、良い一致は見出せなかった。

シミュレーションの結果と Voitchovsky 等の結果の間に良い一致が見出せなかった理由は不明である。Voitchovsky 等の実験条件は、Sapra 等及び Kessler 等の実験条件と比べて塩濃度に違いがある(Voitchovsky 等は 20~40mM KCl、Sapra 等及び Kessler 等は 300mM KCl)。

アンフォールディング過程

筆者は、シミュレーション結果として可視化された bR のアンフォールディング過程を詳しく観察した。C 末端側からの引き抜きでは、全ての結果において、bR のアンフォールディング過程は大きく 4 つの部分に分かれていた。そして、bR は、ヘリックス G&F、E&D、C&B、そして、A の順序でアンフォールドした。N 末端側からの引き抜きでは、128 中の 121 の結果において、bR のアンフォールディング過程は大きく 4 つの部分に分かれ

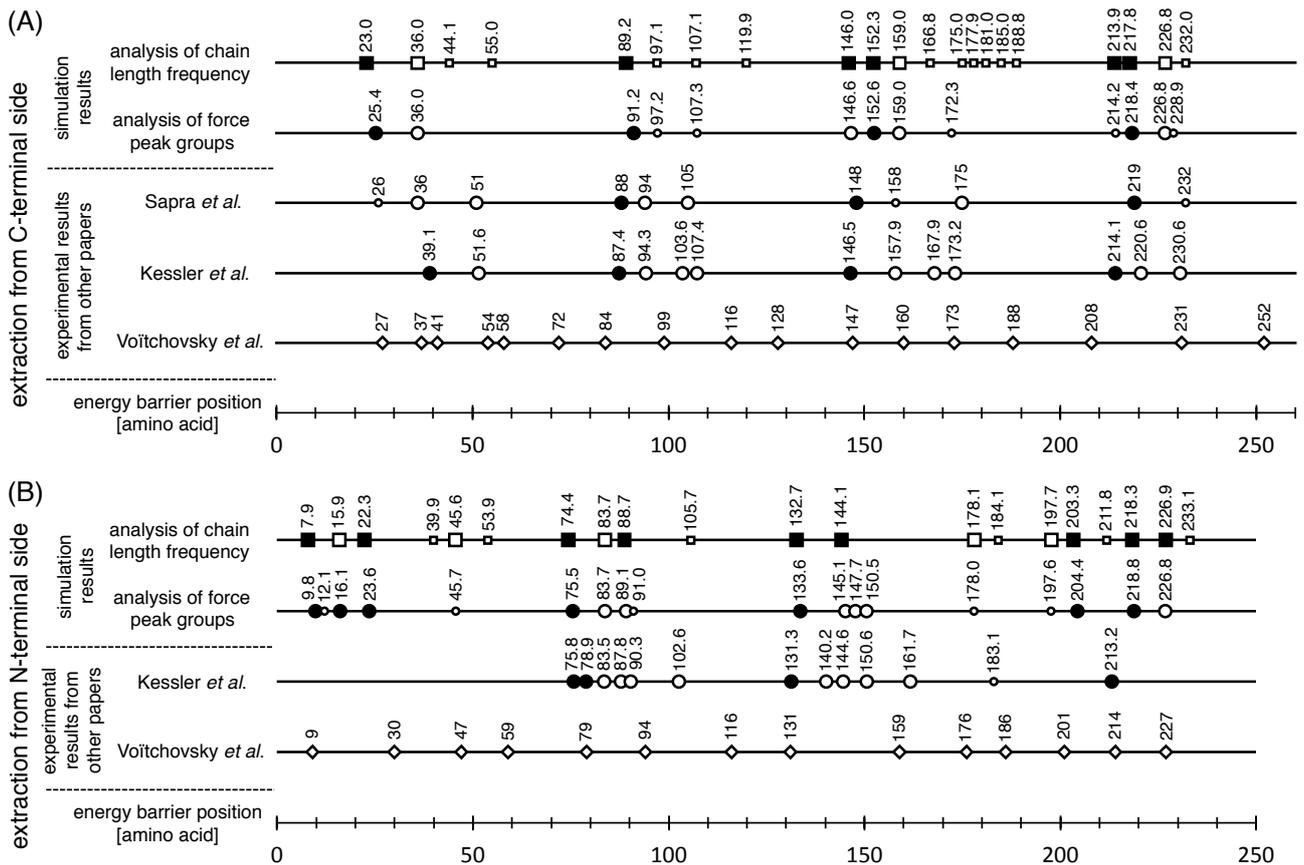


図7: (A, B) バクテリオロドプシンの強制アンフォールディングにおいて出現したエネルギー障壁の出現位置の比較。C 末端側からの引き抜き (A) 及び N 末端側からの引き抜き (B)。横軸はエネルギー障壁の位置、即ち、ピーク出現時の架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基数 (ピークの位置) を表す。線上の印は、力のピークが出現した位置を示す。印の上部の数値は、詳細なピーク位置である。'chain length frequency' の行は、架橋ポリペプチド鎖長の頻度分布の解析 (詳細は S13 を見よ) から見出された障壁位置である。この軸上の印の違いは、頻度の違いに対応している。黒四角は高、白四角は中、小白四角は低である事を表す。'force peaks group' の行は、シミュレーションによる F-D 曲線上に出現したそれぞれのピーク集団の平均による障壁位置である。この軸上の印はピークの出現率を表現している。出現率 x に対して、 $x < 30\%$ を小白丸、 $30\% \leq x < 90\%$ を大白丸、 $90\% \leq x$ を大黒丸で表した。シミュレーション結果、並びに、それぞれの実験結果の間で、エネルギー障壁位置の定義は少しずつ異なる。そこで本研究では、それ等の結果を一つの基準に基づいて換算した (詳細は S14 を見よ)。図中には、筆者が換算した障壁位置が使用されている。C 末端側の比較では、Sapra et al., Kessler et al., 及び Voitchovsky et al. の実験結果を使用した。N 末端側では、Kessler et al. 及び Voitchovsky et al. の実験結果を用いた。Sapra et al. 及び Kessler et al. の行の黒丸、白丸、小白丸の記号は、'force peaks group' の行の記号と同じ意味を表す。Voitchovsky et al. の欄の白ダイヤ印は、障壁位置のみを表す。'chain length frequency' と 'force peaks group' の欄の間では、障壁の位置とその出現頻度は良く対応している。この事は F-D 曲線上のピークの選定において、筆者の主観的な影響が殆ど無かった事を表す。C 末端側の比較では、'force peaks group' に示された障壁位置は、Sapra et al. 及び Kessler et al. の位置と、全体的に良く一致している様に見える。N 末端側の比較では、'force peak group' の障壁位置は、Kessler et al. の行の 75aa~151aa の範囲において良く一致している様に見える。

ていた。これらの場合では、bR は、ヘリックス A&B、C&D、E&F、そして、G の順序でアンフォールドした。しかし、7つの結果では、ヘリックス E の強制的なアンフォールドに先立って、ヘリックス F&G が自発的にアンフォールドし、膜から飛び出た。

次に、筆者は、力のピークが出現したときにおける脂質膜内でのポリペプチド鎖の構造を調べた。その結果、ほとんどの場合において、力のピークの位置が同じであれば、脂質膜内でのポリペプチド鎖の構造もまた部分的に同じである事が分かった。ここで言う部分的とは、ヘリックス対のアンフォールディングの場合ではそのヘリックス対を、単独のヘリックスのアンフォールディングの場合ではその単独のヘリックスの事を意味する。力のピークの出現に伴って現れるポリペプチド鎖の特定の

構造は、エネルギー障壁の形成に関与していると考えられる。

更に、筆者は、力のピークの出現パターンを調べた。つまり、個別のシミュレーション結果について、ヘリックス対や単独のヘリックスがどのような段階を経てアンフォールドするのかを調べた。そして、それらの結果を、それぞれのヘリックス対や単独のヘリックスのアンフォールディング過程ごとに、纏めた (詳細は S16 を見よ)。

最終的に、C 末端側のアンフォールディング過程について、上記の観察を纏めたものを図 8 に示した。また、N 末端側についてのものを図 9、及び、図 10 に示した。

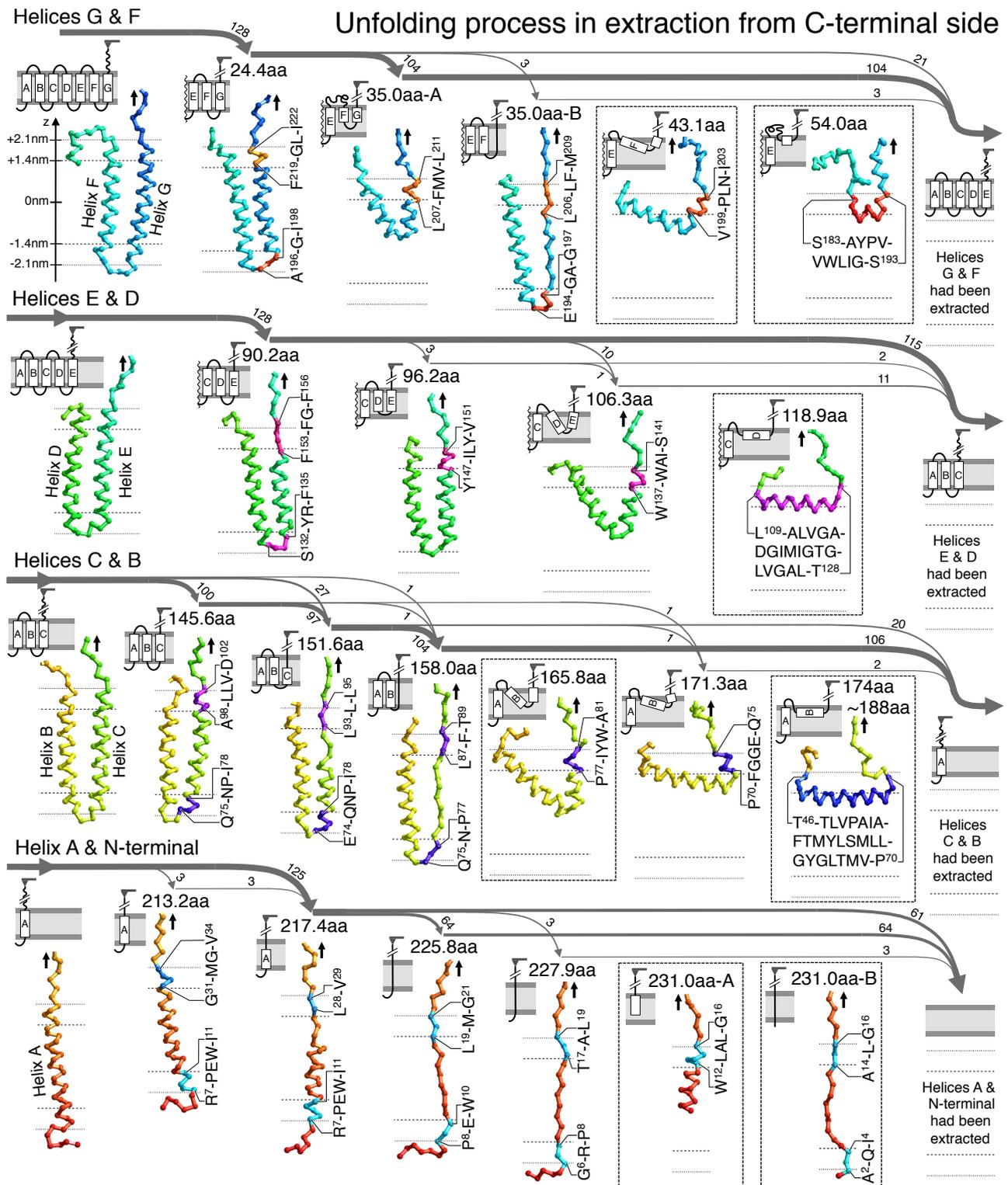


図 8: C 端側から引き抜いた場合における、バクテリオロドプシンの強制アンフォールディング過程。アンフォールディング過程の全体は、Helices G&F, E&D, C&B, 及び Helix A という 4 つの過程に分かれていた。これら 4 つの過程を、4 段に分けて示した。各段の一番左側の図は、その段においてアンフォールドする部分の初期構造を表す。また、一番右側の図は、その部分のアンフォールド後の状態を表す。両図の間に、その段において出現した力のピーク出現時のポリペプチド鎖の構造を示した。ポリペプチド鎖は、C α 原子を球で、C α 原子間を棒で表した。ポリペプチド鎖の背後の点線は、脂質膜の位置を表す。各図の傍らに、図の状態において膜界面付近に存在するアミノ酸の配列を表記した。各図の上部に、障壁の位置を aa として表記し、また、対応する膜貫通ヘリックスの模式図を描いた。各段の上部の灰色の矢印は、128 回のシミュレーションの結果において観察された障壁から障壁への遷移経路を示す。矢印の傍らの数字はその遷移経路が観察された数であり、矢印の太さはその数に比例する。遷移が観察された数は、S15 の解析結果から計算した。架橋ポリペプチド鎖長の頻度解析のみから検出された障壁は、点線の棒で囲って区別した。

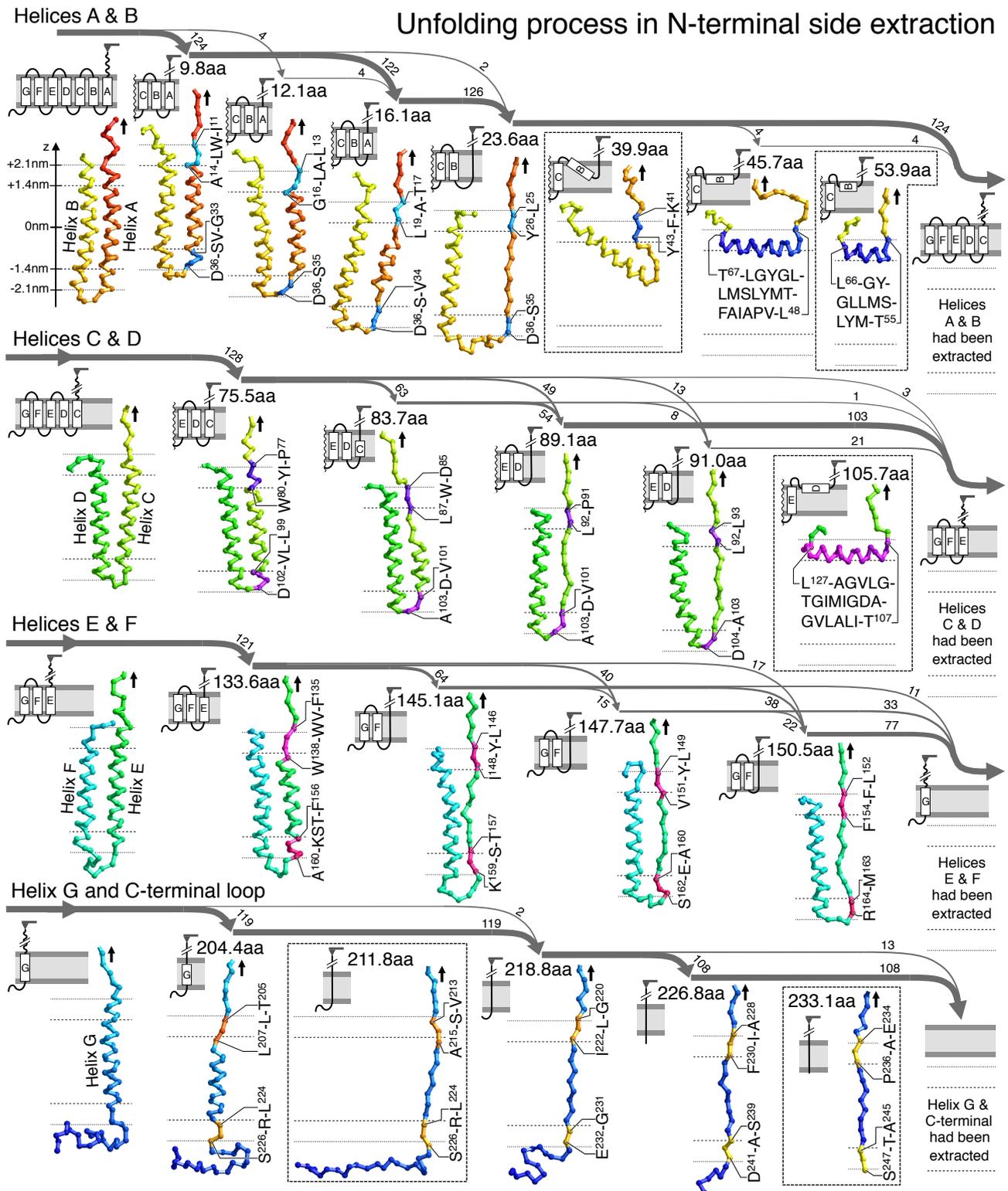


図9: N 端側から引き抜いた場合の強制アンフォールディング過程を4つの段に分けて示した。図の説明は、C 端側から引き抜いた場合と同様である。N 端側の引き抜きでは、ヘリックス E のアンフォールディングに先立って、ヘリックス G&F が自発的にアンフォールドし、基板側へ引き抜ける現象が 128 回中 7 例観察された。それ故、これらの 7 例は、異なるアンフォールディング経路を通ったと考え、別の図に示した。図中の下 2 段では、これら 7 例は除かれている。図9は、N 端側から引き抜いた場合の強制アンフォールディング過程を4つの段に分けて示した。ただし、特殊な7例のヘリックス E 以降のアンフォールディング過程は、これらの結果から除かれている。格段の一番左側は、格段においてアンフォールドする部分の初期構造を、一番右端はアンフォールド後を表す。両者の間に、その段に出現したエネルギー障壁出現時のポリペプチド鎖の構造を描き、図の横に、その状態において膜界面付近に存在し、抽出に抵抗する力を発生している様に見えるアミノ酸の配列を表記した。各々の構造の図の傍らに、障壁の位置を aa として表記し、また対応する膜貫通ヘリックスの模式図を描いた。格段の上部の灰色の矢印は、シミュレーション結果において観察された、障壁から障壁への遷移経路を示す。矢印の傍らの数字は、その遷移経路を選択した数を表し、矢印の太さはその数が多いほど太い。これら遷移経路は、S16 の解析結果から計算された。架橋ポリペプチド鎖長の頻度解析のみから検出された障壁は、点線の枠で囲った。

N 末端側からの引き抜きで観察された強制アンフォールディング過程は、大きく分けて以下の二つの事例が存在した。(i) アンフォールディング過程が、ヘリックス AB, CD, EF, 及び G という四つの部分に分かれている事例であり、121 の結果がこの事例に属した。(ii) ヘリックス E のアンフォールディングに先立ってヘリックス F 及び G、並びに、ループ FG が、自発的に基板側の膜外に引き抜ける現象が見出される事例であり、7つの結果がこの事例に属した。この事例では、アンフォールディング過程は、ヘリックス AB, CD, 及び EFG という三つの部分に分かれていると捉える事が出来る。

N 末端側からの引き抜きでは、強制アンフォールディング過程を二つの図に分けて示した。図 9 では、アンフォールディング過程全体をヘリックス AB, CD, EF, 及び G という四つの部分に分けて図示した。この図の作成には、(i) の事例の全ての結果と (ii) の事例のヘリックス AB 及び CD のアンフォールディング過程の結果を使用した。図 10 には、(ii) の事例のヘリックス EFG のアンフォールディング過程を図示した。この図の作成には、(ii) の事例のヘリックス EFG のアンフォールディング過程の結果を使用した。

考察

AFM を用いて膜タンパク質を脂質膜から引き出し、強制的にアンフォールディングさせる実験では、F-D 曲線が計測される。本研究は、F-D 曲線上に多数の力のピークが出現する仕組みを解明する事を目的とした。そして、この目的の為に、強制アンフォールディング経路中にエネルギー障壁が形成される仕組みを解明する必要があると考えた。

筆者は、障壁形成の仕組みを解明する為に、障壁の位置を支配する相互作用を調べる事が重要であると考えた。そこで、これを調査する為に、独自のシミュレーションモデルを構築し、bR の強制アンフォールディングのシミュレーションを行った。その結果、障壁位置を支配する相互作用が明らかとなった。

筆者は、障壁位置以外の要素についても、上記で行ったシミュレーションの結果を実験結果と比較した。その結果、上記のシミュレーション結果を用いて障壁形成の仕組みを議論できると判断した。そして、障壁形成の仕組みを、強制アンフォールディング経路と共に、明らかにした。更に、これらの結果を用いて、経路中の分岐の行き先の比率を決定する仕組みについて考察した。

障壁位置を支配する相互作用

本論文では、障壁の位置を支配する相互作用について、先行研究を調査し、考察した(イントロダクションを見よ)。そして、その相互作用は、アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性、及び、 α ヘリックス構造の形成に関与する主鎖間の水素結合であると推測した。以下ではこれらを相互作用 X と表す。また、筆者は、障壁位置を支配する相互作用は、平衡状態において膜タンパク質を安定化させている相互作用に含まれていると推測した。それ故、障壁位置を支配する相互作用とは、平衡状態において評価した場合の相互作用 X であると考えた。以下ではこれを相互作用 X_{eq} と表す。

Popot 等は、平衡状態における膜タンパク質のエネルギー的な安定性を説明する二段階モデルを提唱している[13, 14, 15, 16]。このうち一段階目は、水中でランダムコイル構造にあるポリペプチド鎖が個別に安定な膜貫通ヘリックスを形成する段階である。二段階目は、形成された膜貫通 α ヘリックスが互いに会合して三次構造を形成する段階である。相互作用 X_{eq} は、一段階目に関与する相互作用に、丁度等しい。それ故、本研究では、「エネルギー障壁の位置は、主に、二段階モデルのうちの一段階目に関与する相互作用が決定する」という仮説を立てた。そして、この仮説を検証する為に、独自のシミュレーション系を構築し、bR の強制アンフォールディングのシミュレーションを行った。

本研究に用いるシミュレーション系は以下の手順で構築した(詳細はマテリアル&メソッド及び S1, S2 を見よ)。まず、長時間のシミュレーションが可能なポリペプチド鎖の粗視化モデルを使用した。そして、一段階目の相互作用、即ち、相互作用 X_{eq} を、相互作用ポテンシャルとしてシミュレーション系に取り入れた。しかし、二段階目の相互作用、即ち、膜貫通 α ヘリックス間の特異的な相互作用は取り入れなかった。シミュレーション系に与えた相互作用ポテンシャルに含まれる全ての定数は、他の分子力場並びに膜タンパク質の安定性に関する物理化学的現象から導出した。シミュレーション系の時間発展には、ブラウン動力学法を使用した([45] 及び S4, S5)。

構築したシミュレーション系が強制アンフォールディングのシミュレーションに使用できるという事を、以下の手順で検証した。まず、引き抜きを行わないシミュレーションを行った(S6 を見よ)。その結果、bR の 7本の膜貫通 α ヘリックスが、個別に安定に存在できる事が確かめられた。この事は、シミュレーション系において、二段階モデルのうちの一段階目の安定性が適切に再現された事を意味する。次に、適切な引き抜き速度を選ぶ事によって、ポリペプチド鎖の移動に伴って生じる摩擦力が F-D 曲線に及ぼす影響を十分小さくできるという事を確

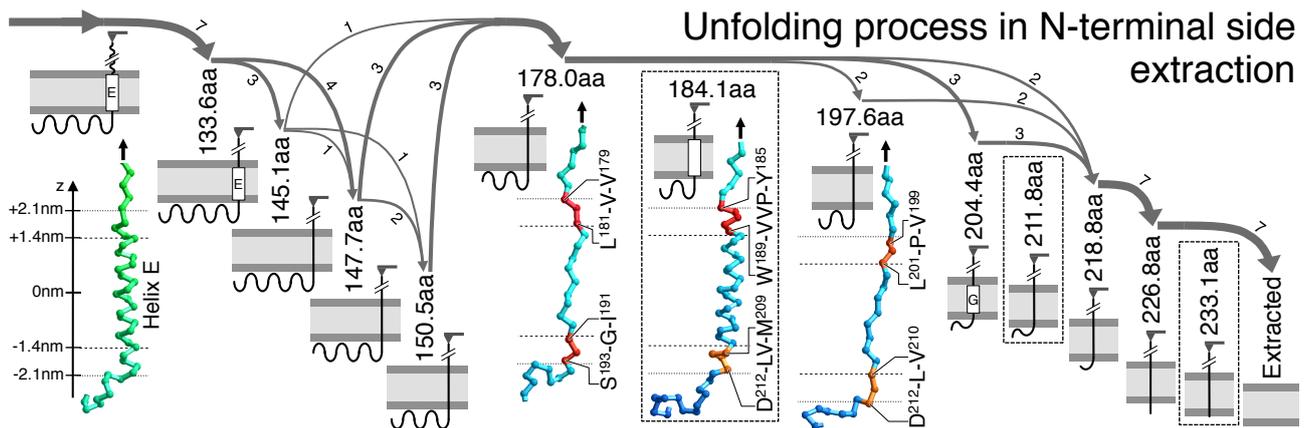


図 10: N 端側から引き抜いた場合の、ヘリックス E のアンフォールディングに先立って、ヘリックス G&F が自発的にアンフォールドするような場合の経路を示す。図の説明は、図 9 と同様である。図の一番左側は、ヘリックス E に先立ってヘリックス G&F がアンフォールドした状態を示す。178.0aa, 184.1aa, 197.6aa のピークは、自発的アンフォールディングが起きなかった経路では出現せず、注目に値する。133.6aa, 145.1aa, 147.7aa, 150.5aa, 204.4aa, 211.8aa, 218.8aa, 226.8aa, 233.1aa の各障壁の出現と、その構造は、自発的アンフォールディングが起きなかった経路と変わりがないように見えた。

認した (S7 を見よ)。更に、ポリペプチド鎖の粗視化モデルの伸張特性は、現実のポリペプチド鎖のそれと大きな違いが無いという事を確認した (S8 を見よ)。これらの事は、シミュレーション結果として算出した F-D 曲線を、実験結果と同様に扱う事ができるという事を確かにする。

その後、bR を C 末端側から、及び、N 末端側から引き抜くシミュレーションを、それぞれ 128 回ずつ行った。そして、得られた F-D 曲線に出現した力のピークを解析した。さらに、強制アンフォールディング経路上に形成されたエネルギー障壁の位置を求めた (結果及び S10, S11, S12, S13 を見よ)。加えて、それらの障壁位置を、実験結果の障壁位置 [20, 21, 31] と比較した (図 7 及び S14 を見よ)。その結果、シミュレーション結果の障壁位置は、実験結果の障壁位置を非常に良く再現している事が分かった (S15 を見よ)。

さらに、一段階目の相互作用のみを取り入れたシミュレーションによって、実験的に観察される障壁位置の大部分を再現できる事が分かった。それ故、一段階目の相互作用はエネルギー障壁の位置の決定に非常に大きく関与していると結論できる。

本研究では、二段階目の相互作用を考慮したシミュレーションは行っていない。既に、二段階目の相互作用が障壁位置の決定に関与しなさそうである事は、イントロダクションにおいて説明した。加えて、以下の考察から、障壁位置への二段階目の相互作用の関与の程度は小さいと結論できる。先ず、一段階目の相互作用のみで、実験結果の障壁位置の大部分が再現されたという事に注目する。この事から、一段階目と二段階目の両方の相互作用が関与して始めて形成されるエネルギー障壁というものは、あったとしても少数であると考えられる。次

に、「二段階目の相互作用だけを取り入れたシミュレーションによっても、実験結果の障壁位置の大部分が再現される」という命題について考える。この命題は、真ではなさそうである。もし、命題が真ならば、次の事が導かれる。それは、二段階目の相互作用のみによって形成される障壁の位置の大部分が、一段階目の相互作用のみによって形成される障壁の位置と一致するという事である。しかし、一段階目と二段階目の相互作用は、互いに異なる相互作用である。互いに異なる相互作用によって形成される障壁の位置の大部分が互いに一致するという事は、なさそうに思える。それ故、二段階目の相互作用のみによって実験結果と一致する位置に障壁が形成されるという事は、あったとしても少数であると考えられる。

シミュレーションと実験結果のその他の一致点

障壁位置を支配する相互作用こそが、エネルギー障壁を潜在的に形成すると考えられる。前セクションの結果は、障壁位置を支配する相互作用が、二段階モデルのうちの一段階目に関与する相互作用である事を示している。また、本研究で行ったシミュレーションは、一段階目の相互作用を考慮している。それ故、本研究のシミュレーションの結果を用いて、エネルギー障壁が形成される仕組みを議論できそうである。この議論を確かなものにする為には、シミュレーション中で観察されたエネルギー障壁の形成の仕組みが、現実の仕組みを十分に再現している事を確かにする必要がある。その為には、シミュレーション結果と実験結果の間で様々な要素を比較すればよい。両者間で一致している要素が多ければ、障壁形成の仕組みもまた一致していると考えられる。そして、シミュレーションに考慮した一段階目の相互作用

が、現実においてエネルギー障壁を形成している相互作用のうちの大部分を占めていると考えられる。

既に議論したように、シミュレーションのエネルギー障壁の位置は、実験結果の位置の大部分を良く再現している。また、シミュレーション結果の F-D 曲線の全体的な形状は、実験結果を良く再現している。C 末端側からの引き抜きのシミュレーションでは、全ての結果において、bR はヘリックス G&F、E&D、C&B、そして、A の順序でアンフォールドした。また、N 末端側からの引き抜きのシミュレーションでは、ほとんどの結果において、bR は、ヘリックス A&B、C&D、E&F、そして、G の順序でアンフォールドした。これらの結果もまた、実験結果 [9, 21] と一致している。

力のピークの大きさや出現率を比較する場合には、注意が必要である。なぜなら、それらは引き抜き速度に影響されるからである。本研究の bR の引き抜き速度 ($v^{\text{cl}} = 1\text{mm/s}$) は、実験において用いられる速度 ($v^{\text{cl}} = 1000\text{nm/s}$) と大きく異なる。そこで、本論文では、シミュレーション結果のスケール変換について考察した(マテリアル&メソッドを見よ)。その結果、スケール変換の解釈を使用すると、本研究のシミュレーションの結果における力のピークの大きさや出現率を、実験結果と直接的に比較する事は妥当だと分かった。それ故筆者は、力のピークの大きさと出現率について、シミュレーション結果と実験結果の間で比較した。

比較の結果、全体的な力のピークの大きさは、概ね再現されている事が分かった。実際、実験結果 [12] のうち引き抜き速度 $v^{\text{cl}} = 1310\text{nm/s}$ において観察された力のそれぞれの力のピークの平均値は、概ね 50~150pN の範囲に分布している。そして、シミュレーション結果において、各々の力のピークの平均値は、概ね 50~100pN の範囲に分布している (S12 を見よ)。また、出現率がほぼ 100%となる力のピークの位置は、シミュレーション結果と実験結果の間に対応関係が見られた。

以上の比較の結果から、筆者は、本研究のシミュレーション結果を用いてエネルギー障壁の形成の仕組みを考えて良いと判断した。

個別の力のピークの大きさや出現率については、シミュレーション結果と実験結果の間で、定量的な対応関係が見られなかった。この事の一つの原因として、シミュレーションに二段階目の相互作用を考慮しなかったという事が考えられる。

相互作用と力の関係

本研究では、アミノ酸残基の脂質膜に対する親和性、及び、 α ヘリックス構造の形成に関与する主鎖間の水素

結合を、相互作用ポテンシャルとしてシミュレーションに取り入れた。そこで、エネルギー障壁の構造を議論する前に、これらの相互作用ポテンシャルによってポリペプチド鎖に働く力について説明する。

脂質膜界面領域では、膜内部の脂質コア領域から膜外部の水領域へ向けて、疎水性環境から親水性環境へと変化している。そして、疎水性分子は、親水性の環境に存在するときよりも、疎水性環境中に存在するときの方が、系全体の自由エネルギーは低下する。それ故、膜界面領域に存在する疎水性の分子は、膜内方向への熱力学的な力を受ける。親水性の分子の場合はこの逆である。ポリペプチド鎖は巨大な分子である為、本研究では、これを主鎖の単位、側鎖、末端の分子断片に区分し、各分子断片ごとに脂質膜との相互作用ポテンシャルを与えた。各分子断片に働く力の大きさは、膜界面領域の中央 ($z=1.75\text{nm}$, -1.75nm) において、最大に達する。この力の最大値は、典型的な疎水性側鎖であるロイシン側鎖では、膜内方向へ 55pN となる。また、典型的な親水性側鎖であるアスパラギン側鎖では、膜外方向へ 46pN となる。電離する側鎖にも膜外方向への力が働き、その大きさの最大値は、アスパラギン酸側鎖において 113pN に達する。主鎖の単位には膜外方向への力が働くが、その大きさは水素結合の状態によって変化する。水素結合をしていない主鎖の単位では、その最大値は 59pN となる。しかし、 α ヘリックス構造を形成しているポリペプチド鎖中に含まれる主鎖の単位の場合では、その最大値は 11pN に減少する。各分子断片に働く力の大きさの最大値は、表 2 に示した。

主鎖間の水素結合の引力的部分を表現する相互作用ポテンシャル (式 10) は、 hbo_i 点と hbh_{i+4} 点の間に引力を及ぼす。この引力の大きさは、二点間の距離 r_i^{hb} が $r_0^{\text{hb}}/3 = 0.0833\text{nm}$ となるとき最大となり、脂質膜中では 294pN、水中では 103pN となる。脂質膜中での主鎖間の水素結合の力の大きさは、膜界面で側鎖や主鎖の単位に働く力の大きさに比べて、非常に強い。しかしながら、一つの水素結合の障壁の幅は薄く (概ね $r_0^{\text{hb}} = 0.25\text{nm}$ と考えられる)、また強制アンフォールディングは非常にゆっくり行われる ($\sim 1\text{s}$)。それ故、水素結合を崩壊させる為に必要な外力の大きさは、熱運動によって大きく低下させられると考えられる。

エネルギー障壁の形成の仕組み

エネルギー障壁の形成の仕組みは、シミュレーション結果の中に再現されていると考えられる。筆者は、C 末端側の力のピークについて、ピーク出現時の膜内のポリペプチド鎖の構造を調べ、形式 I~X に分類した。同時

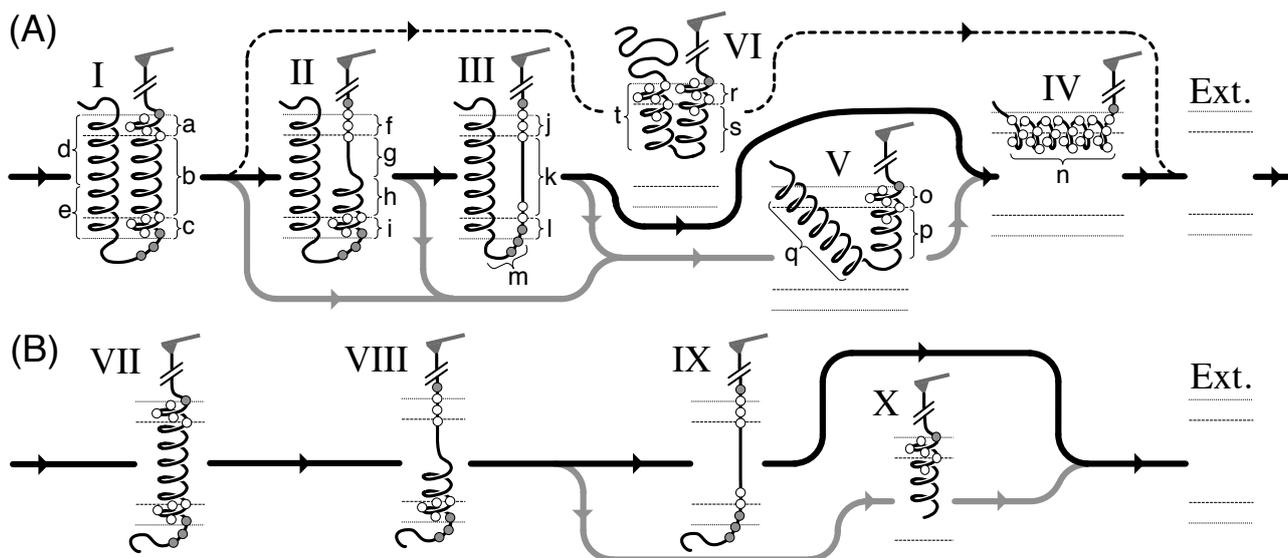


図 11: エネルギー障壁が形成される仕組みの形式、及び、形式間の遷移過程。シミュレーション結果において見出されたエネルギー障壁の形成の仕組みを、ポリペプチド鎖の構造に基づいて 10 個の形式 (I~X) に分類した。Ext. は引き抜かれた状態を表す。(A) は、ヘリックス対の場合に形成されるエネルギー障壁の形式 (I~VI) を示す。(B) は、単独のヘリックスの場合に形成されるエネルギー障壁の形式 (VII~X) を示す。図中の膜界面付近においてのみ、ポリペプチド鎖中の疎水性のアミノ酸を白丸で、親水性のアミノ酸を灰色の丸印で表示した。図中のポリペプチド鎖の構造、アミノ酸の性質、及び形式間の遷移は、シミュレーション結果において観察された平均的かつ代表的なものである。それ故、具体例 (図 8 及び 図 9) とは完全には一致しない。C 末端側の引き抜きで観察された力のピークと、それらを引き起こすエネルギー障壁の形成形式の間の対応関係は、次の通りである。I: 24.4aa, 145.6aa; II: 90.2aa, 151.6aa; III: 35.0aa-B, 158.0aa; IV: 54.0aa*, 118.9aa*, 174aa~188aa*; V: 43.1aa*, 96.2aa, 106.3aa, 165.8aa*, 171.3aa; VI: 35.0aa-A; VII: 213.2aa; VIII: 217.4aa; IX: 225.8aa, 227.9aa, 231.0aa-B; X: 231.0aa-A. N 末端側におけるピークと障壁形式の対応関係は、次の通りである。I: 9.8aa, 75.5aa; II: 12.1aa, 16.1aa, 83.7aa, 133.6aa; III: 23.6aa, 89.1aa, 91.0aa, 145.1aa, 147.7aa, 150.5aa; IV: 45.7aa, 53.9aa*, 105.7aa*; V: 該当無し; VI: 該当無し; VII: 184.1aa*; VIII: 204.4aa; IX: 211.8aa*, 218.8aa, 226.8aa, 233.1aa*, 178.0aa, 197.6aa; X: 該当無し。ここで * 印は、架橋ポリペプチド鎖の残基長の頻度解析のみにおいて観察されたエネルギー障壁位置である事を意味する。

に、膜界面領域に存在するアミノ酸の性質を調べ、型式の分類と共に図 11 に図示した。型式 I~VI については、説明の為に構造中の一部分に a~t の標識を付記した。C 末端側を調査した理由は、障壁位置の再現に有意性が認められたからである。ただし、N 末端側でも、ピーク 39.9aa をのぞき、全てのピークは、図 11 の形式 I~X のどれかに分類できた。

図 11(A) は、ヘリックス対のアンフォールディング過程において観察された障壁の構造を示す。筆者は、ピーク出現時のポリペプチド鎖の構造と、膜界面領域でポリペプチド鎖に働く力から、障壁形成の仕組みを考察した。以下の文中において pN で表された力の大きさは、脂質膜界面の中央における最大値を意味する。

形式 I では、a 部分と c 部分が、引き出し力に対抗する。a 部分には、疎水性の残基 (種類で言えば Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr 及び Val) が頻りに存在する。これらの側鎖は、膜内方向へ約 60pN 程度の力を発揮する。また、a 部分の主鎖は水素結合を形成している。そのような主鎖の単位は膜外方向へ、最大でも 11pN の力しか発揮しない。その結果として、a 部分は正味として膜内方向へ働く力を発揮する。a 部分で打ち消されなかった引き抜き力の残りの部分は、強固なヘリックス構造を持つ b 部分を通して、確実に c 部分に伝えられる。c 部分では、ヘ

リックスを形成した疎水性残基の部分に、親水性残基が隣接している。c 部分の親水性残基は、膜外方向への力を発揮する。特に、Glu, Arg 及び Asp 側鎖では、その力の大きさは約 100pN 程度となる。a, c の両部分に働く力は、協同して引き出し力に抵抗する。

形式 II では、主に i 部分が引き抜き力に抵抗する。f 部分は、疎水性の残基を多く含み、且つ、引き延された状態にある。この場合、側鎖に働く力は、主鎖の単位に働く力 (膜外方向へ 59pN) によって殆ど打ち消される。それ故、f 部分が発揮する正味の力は殆どない。その結果、架橋鎖から及ぼされる引き抜き力は、g 部分及び h 部分を通して、そのまま i 部分に伝えられる。h 部分では、脂質膜中で主鎖間の水素結合を切断するのが困難であるが故に、ヘリックス構造が保たれている。i 部分は、c 部分と同様に、引き抜き力に抵抗する。

形式 III では、主に l 部分が引き抜き力に抵抗する。j 部分は、f 部分と同様に、殆ど抵抗力に寄与しない。それ故、引き抜き力は、k 部分を通して l 部分へ直接伝えられる。l 部分は、親水性の大きな残基を含み、且つ、引き延された状態にある。この場合、側鎖と主鎖の単位に働く力が足し合わされる事になる。Glu, Arg 及び Asp 残基では、一つの残基だけでも膜外方向へ 160pN の力を発揮し、引き抜き力に対抗する。

パターン IV では、従属ヘリックスがカンチレバー側の界面に横たわって存在し、n 部分に多く含まれる疎水性のアミノ酸側鎖が、膜内方向への力を発揮している。このとき、主鎖間には水素結合が形成されているから、主鎖が発揮する膜外方向への力は弱い。本研究では、パターン IV は、C 端側 45.7aa のピークを除き、架橋鎖の頻度統計の結果のみにおいて観察された。

パターン V は、二種類の形成状態がある。一方は、直結ヘリックスのカンチレバー側がアンフォールドし、従属ヘリックスはその構造を保ちながら傾いて存在している状態である。他方は、直結ヘリックスは殆ど引き抜けた後、従属ヘリックスの中間部分が二つに折れ曲がり、e 部分であった部分が直結ヘリックスの一部 (o 及び p 部分) のように振る舞う場合である。折れ曲がり部分にはプロリンが見られる事が多い。また、この場合では、従属ヘリックスのカンチレバー側のループが、従属ヘリックスにいくらか加わる様子が見られた。o 部分は、a 部分と殆ど同じ力を発揮していると考えられるが、パターン V では、パターン I の様に二カ所の抵抗力が連動して働くという事が無いので、ピークの大きさは 30~50pN 程度となっている (C 端側 106.3aa, 171.3aa)。

パターン VI では、直結ヘリックス、及び、従属ヘリックスのカンチレバー側の部分がアンフォールドしている。その結果、e 部分が t 部分に、また、c 部分と b 部分の一部が、r 部分及び s 部分となっている。この状態は、C 端側 35.0aa-A のみにおいてははっきりと観察された。抵抗力の発生の様子は、パターン V とほぼ同一であると考えられる。

型式 IV, V 及び VI では、それぞれ、n 部分、o 部分及び r 部分の疎水性残基によって作られる、それほど強くない抵抗力しか存在しない。その結果として、これらの型式の構造を持つ障壁は、シミュレーションにおいては殆ど観察されないか、非常に小さいピークを出現させるにとどまったと考えられる。しかし、現実においては、これらの型式がより大きなピークを形成する事は、十分に考えられる。なぜなら、実際にポリペプチド鎖は膜界面領域に特異的な吸着を示し [49]、また、芳香族側鎖も膜界面領域に特有の吸着を示す [50] からである。

図 11(B) は、最後に残った単独のヘリックスのアンフォールディング過程において見出された障壁構造を示す。それらは、共役ヘリックス (架橋ポリペプチド鎖に直結したヘリックスに膜外ループを介して結合している膜貫通ヘリックスを指す) を伴わない事を除き、ヘリックス対において観察された障壁の構造とほぼ同様であると考えられる。即ち、形式 VII, VIII 及び IX は、それぞれ、形式 I, II 及び III に対応し、形式 X は、形式 V または VI に対応する。

エネルギー障壁間の遷移過程

筆者は、エネルギー障壁の構造と障壁間の遷移過程 (本文中の図 8, 9)、及び、それらの構造を崩壊させる為に必要な力の大きさ (本文中の図 6) から、強制アンフォールディング過程を推測した。ここで、注意しなければならない事は、エネルギー障壁の乗り越えには、熱運動による確率的な影響が含まれているという事である。それ故、引き抜き速度が遅いほど、乗り越えに必要な力は小さくなる。そこで、本研究では、引き抜き速度 v において各部分を強制的にアンフォールディングさせる為に必要な力の大きさを、引き抜き速度 v における各部分の強制アンフォールディングに対する強度、または単に強度として言及し、以下の議論で使用する。また以下ではパターン間の遷移を矢印 (\rightarrow) で示す。本文中のパターン I~X、及び、部分 a~t は、本文中の図 9 と同じである。

対となったヘリックスのアンフォールディングは、概ね、 $I \rightarrow II \rightarrow III \rightarrow IV \rightarrow Ext.$ の順番で起こる。代表的な例は、C 端側における $145.6aa \rightarrow 151.6aa \rightarrow 158.0aa \rightarrow 171.3aa \rightarrow Ext.$ の遷移である。パターン I において、a, b, c の各部の強度が $a < b < c$ の関係にある場合、最初に a がアンフォールディングし、架橋鎖はたわみ、その結果、引き抜き力は低下する。更に、疎水性のアミノ酸が連続した部分がカンチレバー側の界面にやってくると、b 部分のアンフォールディングは途中で停止する。この結果、 $I \rightarrow II$ の遷移が引き起こされる。各部の強度が $b < a < c$ の関係にある場合、a の直後に、b, c 部分もアンフォールディングするが、c 部分はその場にとどまって I 部分となり、その結果、 $I \rightarrow III$ の遷移となる。各部の強度が $b \approx c < a$ の関係にある場合、a の直後に b, c もアンフォールディングして引き抜け、 $I \rightarrow IV$ の遷移となる。特に、 $b \approx c \ll a$ である場合、a のアンフォールドの直後にヘリックス対は全てアンフォールドし、 $I \rightarrow Ext$ の遷移となる。従属ヘリックスが途中で折れ曲がると、e 部分が直結ヘリックスのようになり、 $I \rightarrow V$ の遷移となる。折れ曲がりは、ヘリックス中にプロリンが存在する部分で起こっているようであるが、プロリンが存在しない場合でも観察された。各部の強度が $c < b \approx a$ の関係にあり、d 部分の疎水性が十分に大きいときには、a 部分のアンフォールドの後、c 部分は b 部分と共にカンチレバー側へ移動し、それと共に従属ヘリックスは回転する。そして、b 部分は疎水性のアミノ酸が連続する部分までカンチレバー側がアンフォールドし、 $I \rightarrow V$ の遷移となる。d 部分の疎水性が小さいときには、a 部分のアンフォールドに引き続いて起こる b, c 部分のカンチレバー側への移動によって、従属ヘリックスにカンチレバー方向の力が加えられ、

d 部分も崩壊し、I → VI の遷移となる。

パターン II において、h 部分と i 部分の強度が $h < i$ のとき、II → III の遷移となる。 $i < h$ の場合には、I → IV, I → V, I → Ext と同じような仕組みで II → IV, II → V, II → Ext の遷移が起こる。

m 部分に強い親水性のアミノ酸が複数含まれ、k 部分に疎水性のアミノ酸が連続する領域が多数含まれている場合、パターン III のエネルギー障壁は、隣接して複数作られ、その結果、III → III の遷移となる。そして、そのような障壁を段階的に超えた後、I → IV, I → V, I → Ext と同じような仕組みで III → IV, III → V, III → Ext の遷移が起こる。

パターン IV は、本研究では殆ど一度に崩壊したが、稀に多段階で崩壊する場合も観察された。

パターン V は、q の親水性が強いつき V → IV となると考えられ、そうでなければ V → Ext となる。

パターン VI は、本研究では一度に崩壊し、VI → Ext が観察された。単独の膜貫通ヘリックスのアンフォールディング過程は、従属ヘリックスが存在しないこと以外、対となったヘリックスのアンフォールディング過程とほぼ同じである。

エネルギー障壁の大きささと幅

エネルギー障壁の高さと幅は、引き抜き速度を変化させた実験によって調べられている。しかし、シミュレーションで観察されたパターン I, III のエネルギー障壁については、その構造から高ささと幅を推測する事は可能である。その結果は、以下のように実験結果と概ね一致する。

型式 I のエネルギー障壁の大きさを、a 部分の 4 つの疎水性側鎖が水中に引き出される事に伴う相互作用ポテンシャルの変化量として算出するなら、それは、概ね $19k_bT$ となる。同様に、型式 III の障壁の大きさを、c 部分の一つの荷電性側鎖とそれに隣接する二つの主鎖の単位が膜中に引き込まれるときの自由エネルギー変化量として算出するなら、それは、概ね $18k_bT$ となる。これらの値は、bR の測定結果から算出された自由エネルギー障壁の大きさ、概ね $19\sim 33k_bT$ 程度 ([51], Supplementary material, Table 2S) と概ね等しいか、幾らか小さい程度である。

また、型式 I, III のエネルギー障壁の構造を考慮すると、本研究のエネルギー障壁の幅は、概ね界面の厚さ、つまり、 0.7nm 程度と考えられる。この値は、bR の測定結果から算出された値、概ね $0.27\sim 0.78\text{nm}$ 程度 ([51], Supplementary material, Table 2S) に大体等しい。

アンフォールディングの経路

本研究で観察されたヘリックス対のアンフォールディング経路は、大きく三つに分けられた。一つ目は、型式 VI の障壁を含む経路である (図 11(A) の点線の経路)。この経路では、二つのヘリックスは共にカンチレバー方向へ移動しながらアンフォールディングする。二つ目は、型式 II, III, および IV の障壁を含む経路である (図 11(A) の黒色の実線で表した経路)。この経路では、共役ヘリックスは膜貫通状態を維持し、直結ヘリックスのみが段階的に解ける。三つ目は、型式 V の障壁を含む経路である (図 11(A) の灰色の実線で表した経路)。この経路では、直結ヘリックスは段階的にアンフォールディングする。そして、共役ヘリックスはヘリックス構造を維持するが、直結ヘリックスのアンフォールディングと共に、脂質膜に垂直な軸に対して次第に傾く。

図 11 では、一つだけの障壁を回避するような経路の描画を省いた。しかしながら、力のピークが観察されなかった事は、障壁を回避する経路が選択された事を意味しているかどうかは分からない。アンフォールディング経路上で二つのエネルギー障壁が隣接している状態を考える。ここで、先立つ障壁が大きいならば、アンフォールディングが引き続く障壁に遭遇するときまで、架橋鎖は大きな張力を保持し得る。さらに、引き続く障壁大きさが小さい場合、この障壁は F-D 曲線に力のピークの痕跡を残す事無く乗り越えられ得る。

また、本研究の結果から次のような事が推測できる。異なる形成の仕組みを持つ障壁が、ほぼ同じ位置にエネルギー障壁を出現させるという事があり得る。このような場合、障壁の大きさは、異なり得る。実際、本研究では、C 端側 35.0aa-A、及び、35.0aa-B においてその様子が観測された。本研究では、35.0aa-B のピーク ($50\sim 75\text{pN}$ 付近の少数の点) の大きさは、35.0aa-A のピーク (図 6 左下図 35.0aa のピークの $15\sim 35\text{pN}$ 付近の多数の点) のそれと比べて、明らかに大きい。だから、実験において、同一の位置に出現したピークの大きさの分布が二つの集団に分かれている場合、異なる型式を持つ二種類の障壁が存在する事が考えられる。

経路の分岐と行き先

アンフォールディング経路の分岐点は、どこに存在しているのだろうか。シミュレーション結果のアンフォールディング過程および図 11 のエネルギー障壁の構造は、エネルギー障壁の部分的な崩壊の仕方によって分岐先が決められると言う事を示している。それ故、分岐点は、障壁の頂点付近に存在すると考えられる。

アンフォールディング経路の分岐の比率には、様々な

相互作用が関与すると考えられる。例えば、先立つ障壁を乗り越える直前の力の大きさ、並びに、架橋ポリペプチド鎖の残基長等が考えられる。分岐比率を決定している仕組みは、今後の研究課題である。

結果及びモデルの問題点

本研究のシミュレーション結果と実験結果の間で、ピーク位置が一致しない部分が存在する事や、ピークの高さ、及び、出現率が正確に再現されなかった理由として、以下の事が考えられる。

本研究では、アミノ酸の脂質膜への親和力は、オクタノール-水分配係数から導いた。しかし、オクタノールは、実際の脂質膜よりも疎水性が弱いと考えられる。この結果として、本研究では、基板側のループ部分に存在する親水性のアミノ酸によって形成されるエネルギー障壁(本文中の図 11 のパターン III)の大きさを、実際よりも幾らか小さく見積もっている可能性がある。そして、この事は、パターン III によって出現するピークの高さや出現頻度の再現性に、不正確さを与えている可能性がある。

また、本研究では、脂質膜中の粘性率が場所によらず均一であると考えたが、現実ではそうでないと考えられる。この事もピークの高さや出現頻度に影響するだろう。高さが ΔG^* 、幅が x_u であるようなエネルギー障壁を、負荷速度 r_f において乗り越える場合、最も高い頻度で観察される力のピークの高さ、 F^* 、は、以下の式で表現される [20]。

$$F^* = \frac{\Delta G^*}{x_u} - \frac{k_b T}{x_u} \ln \left(\frac{k_b T}{x_u \tau_D r_f} \right) \quad (18)$$

ここで、 k_b はボルツマン定数、 T は絶対温度、そして、 τ_D は系の運動の特徴的な拡散時間である。この τ_D の値は、ヘリックス間のパッキングや、脂質との相互作用によって変化する可能性がある。また、 τ_D の影響は、シミュレーション中に粘性率として考慮されていると考えられる。それ故、一定の粘性率という想定を通して τ_D の値を一定としてしまった事が、力のピークの高さの再現性の不正確さとしてシミュレーション結果に現れている可能性がある。

それ以外に、エネルギー障壁の形成に影響を与える問題点として、以下の三つが挙げられる。(i) アミノ酸の膜界面へ吸着性 [49]、及び、芳香族側鎖の特異的な膜界面へ吸着性 [50] を考慮しなかった事。(ii) 主鎖、側鎖の原子間の立体反発力による二面角の制限、及び、主鎖の二面角ポテンシャルを、考慮しなかった事。(iii) 膜内での水素結合力、そして、親水性のフラグメントが近接

するときに親水性が幾らか失われるという近接効果 [43] を考慮しなかった事。

また、本研究では、膜界面の厚さを 0.7nm と想定したが、この厚さの変化とエネルギー障壁の関係性についても、今後詳しく研究する必要がある。

その他

膜タンパク質間、及び、膜タンパク質内部のヘリックス間の相互作用によって、ピークの出現頻度や大きさが変化するという事は確かに観察されている [23, 28, 52, 30, 31, 53, 19, 20, 25, 54]。この事は次のように説明できる。それらの相互作用は、先立って設立されたエネルギー障壁に加わる。その結果として、障壁の高さや幅に影響を与え、また、障壁の出現率を変化させると考えられる。

本研究では、プロリン残基の主鎖の N 原子が水素結合を形成しない事、および、プロリン残基の主鎖の二面角 ϕ の制限をシミュレーションに取り入れた。図 6 の 151.6aa のピークでは、ヘリックス C のうち、アンフォールドされた部分とそうでない部分の境界に P^{91} が見られた。この P^{91} は、型式 II のエネルギー障壁の g 部分と h 部分の境界位置の決定に関与している可能性がある。しかしながら、それ以外に、プロリン残基がエネルギー障壁の構造に積極的に関わっている様子は観察できなかった。

本研究では、対となったヘリックス、または、単独のヘリックスが、一度に、または、段階的にアンフォールディングする様子が観察された。これらの事は、多くの実験的観察(一例として [9])と一致する。

F-D 曲線上のエネルギー障壁位置の情報と膜タンパク質の立体構造の情報とを統合させた解析が存在する。この解析は、エネルギー障壁が、膜内でフォールドしている膜タンパク質のとある部分構造の崩壊に対応していると想定する。そして、立体構造の情報を頼りとして、そのような部分構造を特定し、天然構造上に割り当てる。このような部分構造は、「構造セグメント」と呼ばれている [55]。bR に対して行われた解析では、次のような部分構造に構造セグメントが割り当てられた。それは、対となった膜貫通ヘリックス、または単独のヘリックス [9] 及びヘリックスの一部、更にカンチレバーと反対側に存在する膜タンパク質のループ部分 [23] である。

本研究で観察されたエネルギー障壁の構造は、先行研究によって提案されたアンカーポイント、即ち、隣接する構造セグメントの境界と一定の対応関係にあると考えられる。つまり、ヘリックスのアンフォールディングの場合、直結ヘリックスのカンチレバー側の膜界面付近、直結ヘリックスの中央部、及び、直結ヘリックスの基板

側の膜界面付近に存在する構造セグメントの境界は、それぞれ、図 11 の型式 I、II、及び、III によって形成されていると推測できる。また、従属ヘリックスの内部に存在する境界は、型式 V, IV, VI のエネルギー障壁に対応していると考えられる。

本研究では、実験で観察される bR の F-D 曲線の形状、及び、力のピークの位置が、部分的にはあるが再現された。この再現性は、Seeber 等 [32] や Kappel 等 [34] が行ったシミュレーションに比べ、非常に良い。実験結果がより正確に再現された最大の理由として、本研究で用いた引き抜き速度が、非常に低速だったという事が挙げられる。

本研究では、相互作用を単純化し、更に意図的にヘリックス間の相互作用を省いた。その結果、エネルギー障壁の形成メカニズムを浮かび上がらせる事に成功した。このような研究手法は、計算量が少ない上に、現象の理解に非常に役立つ。加えて、次のような重要な点を強調しておく。それは、本研究のような手法を通して得られる膜タンパク質のシミュレーションモデルは、それ自体が膜タンパク質の構造形成のメカニズムとなる事である。さらに、他の様々な現象を解き明かす為の思考の基盤となり得るという事である。

本研究のシミュレーション手法が、bR だけでなく、他の膜タンパク質にも適用できるかどうかを調査する必要がある。また、本研究で取り入れられなかった相互作用を取り扱う等の、本研究の手法の修正、及び、拡張も行われるべきである。

サマリー

本研究では、bR の強制アンフォールディング実験で観察される F-D 曲線上に力のピークが出現する仕組みを、計算機シミュレーションによって調査した。具体的には、ポリペプチド鎖の粗視化モデルに、膜貫通ヘリックスの形成に関与する相互作用のみを与え、強制アンフォールディング実験のシミュレーションを行なった。すると、実験的に観察される F-D 曲線が再現された。この結果は、F-D 曲線上の力のピークは主に膜貫通ヘリックスの形成に関与する相互作用によって支配されている事を強く示唆している。

サポーターティングマテリアル

S1 シミュレーション系

S1-1 概説

S1-1-1 シミュレーション手法に関する先行研究の紹介

幾つかの先行研究 [37, 38, 39, 40, 41] は、一本の膜貫通 α ヘリックスが形成される過程のシミュレーションを行った。本研究で用いたシミュレーション手法は、それらの先行研究において用いられたシミュレーション手法と、概念的に似ている部分が多い。例えば、それらの先行研究では、粗視化されたポリペプチド鎖のモデルが使用された。また、ポリペプチド鎖が脂質膜に吸着する性質、並びに、主鎖間の水素結合の効果が、相互作用ポテンシャルとしてシミュレーションに取り入れられている。

一方、両手法の間で異なる部分も多い。例えば、それらの先行研究では、一つのアミノ酸残基を一つの球として表現した。しかし、本研究では、一つの主鎖のペプチド結合部分を一つの内部構造を持つ剛体球粒子として表現した。また、このような粗視化モデルの違いから、両手法の間でポテンシャルの表式の多くの部分に違いが生じている。さらに、それらの先行研究ではモンテカルロ法が用いられたが、本研究ではブラウン動力学法を用いる。

上記に様に、両手法の間には似ている部分も存在するが、違いも多い。それ故以下では、本研究のシミュレーション手法を、それらの先行研究を拡張したものとしてではなく、それらとは独立したものとして記述する。

S1-1-2 本研究の目的と方針

膜タンパク質の強制アンフォールディング実験において測定された F-D 曲線上には、多数の力のピークが出現する。本研究の重要な目的は、それらのピークが出現する仕組みに、とある相互作用がどの程度関与しているかを調査する事である。ここで、とある相互作用とは、Popot 等によって提唱された二段階モデル [13, 14, 15, 16] のうちの一段階目に関与する相互作用の事である。この相互作用は、水中でランダムコイル構造にあるポリペプチド鎖に、膜貫通 α ヘリックス構造を形成させる。

本研究の目的を達成する為に、筆者は次の研究方針を採用した。まず、一段階目の相互作用を取り入れ、二段階目の相互作用を無視した膜タンパク質のシミュレーション系を作成する。次に、そのシミュレーション系を

用いてバクテリオロドプシン (bR) の強制アンフォールディングシミュレーションを行い、F-D 曲線を算出する。最終的に、F-D 曲線に出現した力のピークの位置を、シミュレーションと実験の間で比較する。もし、シミュレーション結果が実験結果を良く再現しているのであれば、力のピークの出現に一段階目の相互作用は深く関与していると考えられる。

S1-1-3 シミュレーションモデルに要請される事

この方針に基づいて本研究を遂行する為には、使用するシミュレーションモデルに幾つかの事が要請される。明白な事は以下の二つである。一つ目は、シミュレーションモデルには、一段階目の相互作用が考慮されているという事である。二つ目は、シミュレーションモデルには、膜タンパク質の引き抜きを実行する機能が与えられているという事である。これら以外に、以下の事が挙げられる。

まず、使用するシミュレーションモデルは十分に計算量の小さいものでなければならない。なぜなら、本研究では、シミュレーション結果と実験結果の間で力のピークの位置を比較する事が重要な要素となるからである。この為には、以下の二つの事が必要となる。一つ目は、シミュレーションにおいて、膜タンパク質を極めて低速度で引き抜く事である。この事は、ポリペプチド鎖が溶媒中を移動する事で生じる粘性摩擦力が、F-D 曲線に対して引き起こす変形を小さくする。二つ目は、多数のシミュレーションを実行し、算出された F-D 曲線を統計的に解析する事である。この事は、熱運動の影響を排除して障壁位置を正確に算出する為に、また、出現頻度の低いエネルギー障壁を見出す為に必要である。

また、膜貫通 α ヘリックスを、脂質膜内の特定の部分に留めておく仕組みが必要である。なぜなら、本研究ではヘリックス間の相互作用を計算に取り入れれない。その為、膜貫通ヘリックスは脂質膜中を拡散し、ヘリックス間のループが許す限り広がってしまうからである。

S1-1-4 本研究での基本的なモデル

上記の要請を実現する為に、本研究では研究の目的と方針に適したシミュレーション系を開発した。それは、以下のようなものである。

本研究では、ポリペプチド鎖の主鎖のみを粗視化モデルによって明示的に扱う。この主鎖は、“ペプチド結合粒子”と名付けた剛体粒子を直鎖状に連結する事によって表現した。このペプチド結合粒子とは、一つのペプチド結合平面を一つの剛体粒子と見なしたものであり、そ

の詳細は S1-2 に記述した。また、多数のペプチド結合粒子を鎖状に連ね、現実のポリペプチド主鎖のように振る舞わせる為の相互作用ポテンシャルは、S1-4 に説明した。

二段階モデル [13, 14, 15, 16] のうちの一段階目に関する相互作用は、水中でランダムコイル構造にあるポリペプチド鎖に膜貫通 α ヘリックス構造を形成させる。この相互作用は、以下の二つの部分に分けて取り入れた。一方は、アミノ酸残基の脂質膜への親和性のうちポリペプチド鎖の構造に依存しない部分を表現する部分であり、この効果は陰溶媒モデルとして取り入れた。つまり、脂質膜及び水を連続体と見なし、空間中に固定された領域と考える。そして、脂質膜に対するポリペプチド鎖の各部分の相対的な位置によって変化するポテンシャル項を、系全体のポテンシャルに加えた。このポテンシャル項の詳細は、S1-5 に記述した。もう一方は、主鎖間の水素結合を表現する部分であり、この効果はペプチド結合粒子間の引力的ポテンシャルとして取り入れた。この水素結合エネルギーの大きさは、その水素結合が形成されている位置（つまり脂質膜中か、水中か）によって変化する。このポテンシャル項の詳細は、S1-6 に記述した。これら一段階目に関する相互作用を上記の二つの部分に分ける事については、S1-1-5 で詳しく解説した。

本研究では、膜タンパク質を引き抜くカンチレバーと同様のものを、シミュレーション系に実装した。この模擬的なカンチレバーの構造と、カンチレバーの歪みエネルギーを表現するポテンシャル項は、S1-7 に詳しく説明した。

本研究の手法では、側鎖間の相互作用は計算に取り入れられていないので、膜貫通ヘリックスは脂質膜中を拡散し、ヘリックスを互いに繋ぎ止めるループの長さが許す限り広がってしまう。これを防止する為、とあるポテンシャルを与えて、脂質膜内においてポリペプチド鎖が移動出来る範囲を制限した。このポテンシャルについては、S1-8 に詳しく記述した。

S1-1-5 一段階目の相互作用の分割

二段階モデル [13, 14, 15, 16] のうちの一段階目に関する相互作用は、水中でランダムコイル構造にあるポリペプチド鎖に膜貫通 α ヘリックス構造を形成させる。この相互作用には、二つの効果がある。一方は、ランダムコイル状態のポリペプチド鎖に α ヘリックス構造を形成させる効果である。もう一方は、ポリペプチド鎖の一部を脂質膜中に押し込めたり、水中に引き留めたりする効果である。

これら両者の効果は互いに関わり合っており、完全に

は分離できない。例えば、水中にあるポリペプチド鎖が α ヘリックス構造を形成すると、その部分はより脂質膜中に押し込められやすくなる。これは以下の理由による。水中での α ヘリックス構造の形成過程では、主鎖の C=O 及び N-H 基に結合した水分子が脱水されると共に、主鎖内で水素結合が形成される。つまり、 α ヘリックス構造のポリペプチド鎖を水中から膜中へ輸送するときには、主鎖に結合している水分子は既に存在せず、脱水する必要がなくなる。その結果、 α ヘリックス構造を形成しているポリペプチド鎖は、ランダムコイル状態にあるときよりもより容易に膜中へ輸送できることになる。また、ランダムコイル状態にあるポリペプチド鎖を脂質膜中に引き込むと、 α ヘリックス構造を形成しやすくなる。これは以下の理由による。ランダムコイル状態にあるポリペプチド鎖を水中から膜中に輸送する過程は、主鎖の C=O 及び N-H 基に結合した水分子の脱水を伴う。つまり、膜中でポリペプチド鎖が α ヘリックス構造を形成するときには、主鎖に結合した水分子を脱水する必要がなくなる。その結果、膜中でランダムコイル状態にあるポリペプチド鎖は、水中にあるときに比べてより容易に α ヘリックス構造を形成できる。

以上の事から、一段階目の相互作用を表現するポテンシャル U_{1st} は、ポリペプチド鎖中のアミノ酸残基によって定義される座標 \mathbf{q} の関数として、形式的に、次式で表す事が出来る。

$$U_{1st}(\mathbf{q}) = U_{w,r \rightarrow m,r}(\mathbf{q}_{pos}) + U_{w,r \rightarrow w,h}(\mathbf{q}_{helix}) + \tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}(\mathbf{q}_{pos}, \mathbf{q}_{helix}) \quad (19)$$

ここで、 \mathbf{q}_{pos} は、ポリペプチド鎖中の各アミノ酸残基の位置（つまり、水中にあるか膜中にあるか）によって定義される座標であり、 \mathbf{q} より導かれる。 $U_{w,r \rightarrow m,r}$ は、ランダムコイル状態にあるポリペプチド鎖を水中から膜中に輸送するときの系の自由エネルギー変化を表現するポテンシャル項である。 \mathbf{q}_{helix} は、ポリペプチド主鎖中の各アミノ酸残基が α ヘリックス構造を形成している度合いによって定義される座標であり、 \mathbf{q} より導かれる。この座標は、主鎖間で水素結合が形成されている度合いと考えて差し支えない。 $U_{w,r \rightarrow w,h}$ は、ポリペプチド鎖が、水中においてランダムコイル状態から α ヘリックス構造を形成するときに伴う系の自由エネルギー変化を表現するポテンシャル項である。 U_{1st} 、 $U_{w,r \rightarrow m,r}$ 、及び、 $U_{w,r \rightarrow w,h}$ は、ポリペプチド鎖が水中でランダムコイル状態にあるときを 0 とする。 $\tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}$ は、 U_{1st} の内、 $U_{w,r \rightarrow m,r}$ と $U_{w,r \rightarrow w,h}$ の単純な和では表現できない部分を表現するポテンシャル項である。

$U_{w,r \rightarrow m,r}$ 及び $U_{w,r \rightarrow w,h}$ の意味は明瞭であるが、 $\tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}$ は直感的に理解しづらい。そこで、 $\tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}$ を、 $U_{w,r \rightarrow m,r}$

または $U_{w,r \rightarrow w,h}$ のどちらかに組み入れる事が考えられる。 $\tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}$ を $U_{w,r \rightarrow m,r}$ に組み入れる場合、次の事が必要となる。即ち、各残基を水中から膜中に輸送するとき生じる系の自由エネルギー変化を表現する為に、二つの場合の間で異なる相互作用ポテンシャルを使用する事である。ここで二つの場合とは、ポリペプチド鎖がランダムコイル状態にあるときとヘリックス構造を形成しているときの事である。また、 $\tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}$ を $U_{w,r \rightarrow w,h}$ に組み入れる場合、次の事が必要となる。即ち、主鎖間の水素結合が膜内で形成される場合と、膜外で形成される場合とで異なる相互作用ポテンシャルを使用する事である。

本研究では、後者の方法を採用した。つまり、 $\tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}$ を $U_{w,r \rightarrow w,h}$ に組み入れた。それによって、 U_{1st} は、形式的に、次式で表現される。

$$U_{1st}(\mathbf{q}) = U^{\text{mem}}(\mathbf{q}_{\text{pos}}) + U^{\text{hb}}(\mathbf{q}_{\text{pos}}, \mathbf{q}_{\text{helix}}) \quad (20)$$

ここで、 U^{mem} は、各残基を水中から膜中に輸送するとき生じる系の自由エネルギー変化のうち、ポリペプチド鎖の構造に依存しない部分を表現するポテンシャル項であり、次式で定義される。

$$U^{\text{mem}}(\mathbf{q}_{\text{pos}}) = U_{w,r \rightarrow m,r}(\mathbf{q}_{\text{pos}}) \quad (21)$$

また、 U^{hb} は、ポリペプチド鎖がランダムコイルからヘリックス構造を形成するとき生じる系の自由エネルギー変化を表現するポテンシャル項であり、次式で定義される。

$$U^{\text{hb}}(\mathbf{q}_{\text{pos}}, \mathbf{q}_{\text{helix}}) = U_{w,r \rightarrow w,h}(\mathbf{q}_{\text{helix}}) + \tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}(\mathbf{q}_{\text{pos}}, \mathbf{q}_{\text{helix}}) \quad (22)$$

結果として、 $\tilde{U}_{w,r \rightarrow m,h}(\mathbf{q}_{\text{pos}}, \mathbf{q}_{\text{helix}})$ は、主鎖間の水素結合が水中または膜中で形成されるときに伴う系の自由エネルギー変化の違いを表現している事になる。実際のシミュレーションモデルにおける具体的な表式は、 U^{mem} については S1-5 に、 U^{hb} については S1-6 に記述した。

S1-2 ポリペプチド主鎖の粗視化モデル

S1-2-1 主鎖のモデルへの要請

本研究のシミュレーションに用いるポリペプチド主鎖の粗視化モデルには、次の二つの事が要請される。一方は、現実のポリペプチド鎖の伸張特性、並びに、主鎖間の水素結合を適切に表現出来るという事である。この事は、シミュレーション結果と実験結果の間の適切な比較の為に必要である。もう一方は、計算量が十分に小さい事である。この事は、シミュレーションにおいて非常に

低速度での膜タンパク質の引き抜きを実現する為、及び、多数のシミュレーションを実行する為に必要である。

S1-2-2 適切な粗視化モデルの考え方

現実の主鎖の運動では、 C^α 原子周りの二面角 ψ, ϕ は大きく変化し得る。しかし、主鎖内の原子間結合距離、原子間結合角、及び、ペプチド結合平面の二面角 ω の変化は非常に小さい。それ故、主鎖の一つのペプチド結合に含まれる CONH 原子及びそれを挟む二つの C^α 原子 (C^α -CONH- C^α) の、合わせて6原子の相対的配置は、主鎖構造の変化に対して殆ど変化しないと見なせる。すると、 C^α -CONH- C^α の部分を一つの剛体粒子と考える事が出来る。そして、この剛体粒子を多数連結してポリペプチド鎖を表現するような粗視化モデルが考えられる。このペプチド結合粒子モデルでは、側鎖を構成する原子は無視され、主鎖のみが、明示的に扱われる。

S1-2-2 ペプチド結合粒子

本研究では、次のようなポリペプチド鎖の粗視化モデルを新たに開発した。まず、主鎖の一つのペプチド結合を表現する為に、一つの剛体粒子を考える。この剛体上に固定された座標系 $(\hat{x}, \hat{y}, \hat{z})$ を考え、粒子の内部座標系と呼ぶ。粒子の内部座標系上に $C^{\text{ac}}, C, O, N, H, C^{\text{an}}, \text{hbo}$,

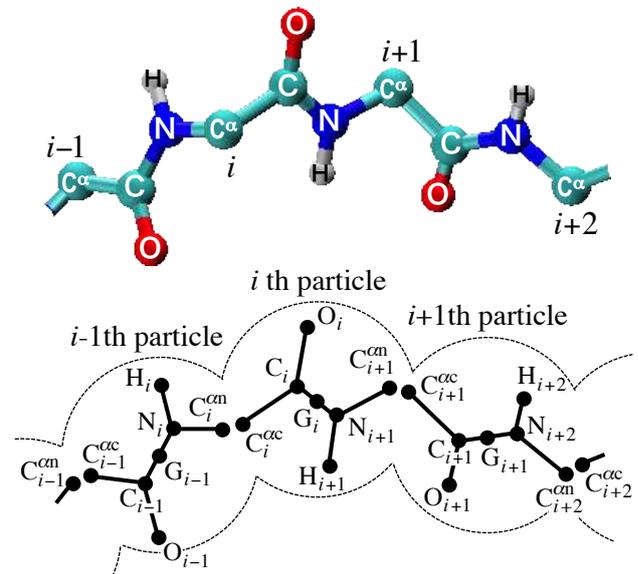


図 S1-1: ポリペプチド鎖のモデルの比較。ストランド構造のポリペプチド主鎖を原子モデルで表現したもの（上図）と、ペプチド粒子モデルで表現したもの（下図）。両図は主鎖のうちの同一の部分を表している。原子モデル中の i 番の C^α 原子は、ペプチド結合粒子モデルにおいては、 $i-1$ 番目の粒子に含まれる C^{ac} 点と i 番目の粒子に含まれる C^{an} 点の中点として表現される。 C^{ac} と、 C^{an} の間の距離は、設定したポテンシャルにより、シミュレーション全体を通して 0.01nm 程度に保たれる。

hbh の 8 つの点を配置する (本文図 1)。前者の 6 点は、ペプチド結合に含まれる CONH 原子とそれを挟む二つの C^α 原子の相対的配置に対応している。hbo, hbh の 2 点は、主鎖間の水素結合を表現する為に剛体上に与えられた結合点である (後述)。本研究ではこの剛体粒子をポリペプチド鎖の表現に用いる基本的な粒子とし、以下では”ペプチド結合粒子”または単に”粒子”と呼ぶ。さらに、8 つの各点の内部座標系上における座標を表す列ベクトルを、先に示した順に、 $\hat{r}^{ac}, \hat{r}^C, \hat{r}^O, \hat{r}^N, \hat{r}^H, \hat{r}^{an}, \hat{r}^{hbo}, \hat{r}^{hbh}$ とする。これらの列ベクトルの成分は、本文中の表 1 に示した。

S1-2-3 ペプチド結合粒子の位置と向き

シミュレーションを行う空間の座標系 (x, y, z) を定義し、この単位ベクトルを $\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}$ とし、以下では外部座標系と呼ぶ。外部座標系上での粒子の位置は、その粒子に固定した内部座標系の原点の位置で表し、これを \mathbf{r} とする。

$$\mathbf{r} = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (23)$$

また、粒子の向きは、粒子の内部座標系の向きを表す行列 \mathbf{A} を用いて、以下のように表す。

$$\mathbf{A} = (\mathbf{x}', \mathbf{y}', \mathbf{z}') \quad (24)$$

ここで $\mathbf{x}', \mathbf{y}', \mathbf{z}'$ は、それぞれ、外部座標系 (x, y, z) において内部座標系 $(\hat{x}, \hat{y}, \hat{z})$ の単位ベクトルを成分表示した列ベクトルであり、 $\mathbf{x}' = (e_{\hat{x}x}, e_{\hat{x}y}, e_{\hat{x}z})^T$, $\mathbf{y}' = (e_{\hat{y}x}, e_{\hat{y}y}, e_{\hat{y}z})^T$, $\mathbf{z}' = (e_{\hat{z}x}, e_{\hat{z}y}, e_{\hat{z}z})^T$ である。即ち、

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} e_{\hat{x}x} & e_{\hat{y}x} & e_{\hat{z}x} \\ e_{\hat{x}y} & e_{\hat{y}y} & e_{\hat{z}y} \\ e_{\hat{x}z} & e_{\hat{y}z} & e_{\hat{z}z} \end{pmatrix} \quad (25)$$

である。

S1-2-4 座標変換

粒子上に固定された点 P を考え、内部座標系における座標を列ベクトルとして表したものを $\hat{\mathbf{r}}^P = (\hat{x}^P, \hat{y}^P, \hat{z}^P)^T$ とする。粒子が位置 \mathbf{r} 、向き \mathbf{A} にあるとき、点 P の外部座標系上における座標を表す列ベクトル $\mathbf{r}^P = (x^P, y^P, z^P)^T$ は、座標変換

$$\mathbf{r}^P = \begin{pmatrix} x^P \\ y^P \\ z^P \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} e_{\hat{x}x} & e_{\hat{y}x} & e_{\hat{z}x} \\ e_{\hat{x}y} & e_{\hat{y}y} & e_{\hat{z}y} \\ e_{\hat{x}z} & e_{\hat{y}z} & e_{\hat{z}z} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{x}^P \\ \hat{y}^P \\ \hat{z}^P \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (26)$$

によって与えられる。このようにして、先に粒子内部に定義した 8 つの点の内部座標は、外部座標系に変換できる。位置 \mathbf{r}_i 、向き \mathbf{A}_i にある i 番目の粒子に含まれる 8 つの点 $C^{ac}, C, O, N, H, C^{an}, hbo, hbh$ の、外部座標系における座標を表す列ベクトルを、 $\mathbf{r}_i^{ac}, \mathbf{r}_i^C, \mathbf{r}_i^O, \mathbf{r}_{i+1}^N, \mathbf{r}_{i+1}^H, \mathbf{r}_{i+1}^{an}, \mathbf{r}_i^{hbo}, \mathbf{r}_{i+1}^{hbh}$ とする。

S1-2-5 粒子中の原子座標と結合角及び二面角の定義

ペプチド結合粒子モデルでは、同一の C_i^α 原子が、 C_i^{an} と C_i^{ac} と言う、二つの座標で表される。ポテンシャルの定義や、そこから導かれる力とトルクの計算を単純かつわかりやすくするため、以下の工夫を行なった。先ず、 C_i^α 原子の座標 \mathbf{r}_i^α を、次式で記述する。

$$\mathbf{r}_i^\alpha = \frac{1}{2}(\mathbf{r}_i^{an} + \mathbf{r}_i^{ac}) \quad (27)$$

この座標は、脂質膜内外のアミノ側鎖の自由エネルギー差の計算に使用される。

結合角と二面角の計算には、 C^α 原子の座標を用いない。此の理由は、粒子に働く力の計算を単純にする為である。但し、 C_i^{an} と C_i^{ac} の距離が十分に小さく保たれているなら、実質的な違いは無い。結合角 $\theta_i = \angle N_i C_i^\alpha C_i$ を、次のように求める。

$$\theta_i = \cos^{-1} \left\{ \frac{(\mathbf{r}_i^N - \mathbf{r}_i^{an}) \cdot (\mathbf{r}_i^C - \mathbf{r}_i^{ac})}{|\mathbf{r}_i^N - \mathbf{r}_i^{an}| |\mathbf{r}_i^C - \mathbf{r}_i^{ac}|} \right\} \quad (28)$$

そこで二面角は次のように算出する。先ず、 i 番目の粒子を平行移動させて、 \mathbf{r}_i^{an} と \mathbf{r}_i^{ac} を重ねる。此のとき新たな座標、

$$\mathbf{r}_i^C = \mathbf{r}_i^C + (\mathbf{r}_i^{an} - \mathbf{r}_i^{ac}) \quad (29)$$

$$\mathbf{r}_{i+1}^N = \mathbf{r}_{i+1}^N + (\mathbf{r}_i^{an} - \mathbf{r}_i^{ac}) \quad (30)$$

が求まる。此の座標を使用して、

$$\phi_i = \angle C_{i-1} N_i C_i^{an} C_i' \quad (31)$$

及び、

$$\psi_i = \angle N_i C_i^{an} C_i' N_{i+1}' \quad (32)$$

とする。

S1-2-6 最終的に得られる変数

結果として、 $\mathbf{r}_i^N, \mathbf{r}_i^H, \mathbf{r}_i^\alpha, \mathbf{r}_i^C, \mathbf{r}_i^O$ の座標は、ポリペプチド鎖を構成する i 番目のアミノ酸の $N_i, H_i, C_i^\alpha, C_i, O_i$ の各原子の座標と殆ど同一視できる。 θ_i は、 i 番目のアミノ酸の $NC^\alpha C$ 原子間結合角、 ϕ_i, ψ_i は、 i 番目のアミノ

酸の C^α 原子周りの二面角と殆ど同一視できる。

S1-3 系の状態とポテンシャル

S1-3-1 シミュレーション系の状態

本研究では、 i 番目の粒子の位置及び向きを、それぞれ、 \mathbf{r}_i 及び \mathbf{A}_i で表す。N 末端及び C 末端もまた、それぞれ一つのペプチド結合粒子として扱う。その結果、 N 残基のポリペプチド鎖は、 $N + 1$ 個の粒子を用いて表現される。粒子の番号は、N 末端のものを 0 とし、C 末端側に向けて連番とする。C 末端の粒子の番号は N となる。シミュレーション系全体の状態 \mathbf{q} は、次式で表した。

$$\mathbf{q} = \{\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{A}_0, \mathbf{A}_1, \dots, \mathbf{A}_N, \mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}\} \quad (33)$$

ここで、 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ はカンチレバーの根元の座標である (詳細は後述する)。

S1-3-2 シミュレーションの全ポテンシャル

系全体のポテンシャル U^{sys} は、次式で表した。

$$U^{\text{sys}} = U^{\text{pep}} + U^{\text{mem}} + U^{\text{hb}} + U^{\text{cl}} + U^{\text{wall}} \quad (34)$$

ここで、 U^{pep} は、主鎖間の水素結合の引力的部分を除くポリペプチド鎖内部の相互作用である。 U^{mem} は、ポリペプチド鎖の脂質膜に対する親和性を表現するポテンシャル項である。 U^{hb} は、ポリペプチド主鎖間の水素結合の引力的部分を表現するポテンシャル項である。 U^{cl} は、カンチレバーの歪みエネルギーを表現するポテンシャル項である。 U^{wall} は、脂質膜内でのポリペプチド鎖の運動を一定の範囲内に制限する為のポテンシャル項である。

S1-4 ポリペプチド鎖内部のポテンシャル

S1-4-1 ポリペプチド鎖内部のポテンシャルの構成

U^{pep} は、ポリペプチド鎖内部の相互作用であり、次式で表した。

$$U^{\text{pep}} = U^{\text{b}} + U^{\text{a}} + U^{\text{da}} + U^{\text{rep}} \quad (35)$$

ここで、 U^{b} は、粒子を互いに結びつけ、ポリペプチド鎖を構成する為のポテンシャル項である。 U^{a} は、結合した粒子間に作り出される C^α 原子周りの結合角 $\angle NC^\alpha C$ を平衡角の周りに束縛するポテンシャル項である。 U^{da} は、プロリン残基の二面角 ϕ を束縛するポテンシャル項

である。 U^{rep} は、ポリペプチド鎖が重なったり互いに通り抜けるような非現実的な運動を妨げる為のポテンシャル項である。

S1-4-2 ポテンシャル項 U^{b}

U^{b} は、ペプチド結合粒子を互いに繋ぎ合わせてポリペプチド鎖を形成する為のポテンシャル項であり、次式で表した。

$$U^{\text{b}} = \sum_{i=1}^N U_i^{\text{b}} \quad (36)$$

ここで、 U_i^{b} は、粒子 $i-1$ と粒子 i を繋ぎ止めるポテンシャル項である。即ち、粒子 $i-1$ に含まれる点 $C_i^{\alpha\text{n}}$ の座標と、粒子 i に含まれる点 $C_i^{\alpha\text{c}}$ の座標との間の距離を 0 付近に束縛する (図 S1-1 を見よ)。 U_i^{b} は次式で表した。

$$U_i^{\text{b}} = \frac{k^{\text{b}}}{2} (\mathbf{r}_i^{\alpha\text{c}} - \mathbf{r}_i^{\alpha\text{n}})^2 \quad (37)$$

ここで、 $k^{\text{b}} = 125.02 \text{J/m}^2$ を用いた。

本研究がこのような束縛ポテンシャルを用いた理由について以下に説明する。本来、点 $C_i^{\alpha\text{n}}$ と点 $C_i^{\alpha\text{c}}$ は同一の C_i^α 原子を表しているのだから、それら二点の座標はシミュレーション中で常に一致しているべきである。それ故、シミュレーション中では、それら二点の間の距離が 0 となるよう拘束しながら粒子を運動させるべきであるはずである。しかし、そのような拘束を行う事は、シミュレーションプログラムを複雑にし、さらに、長時間のシミュレーションを困難にする。一方、次の事もまた事実である。それは、現実のポリペプチド主鎖では、ペプチド結合平面 ($C^\alpha\text{-CONH-C}^\alpha$) に含まれる二つの C^α 原子間の距離は、幾らか伸び縮みできるという事である。なぜなら、ペプチド結合平面に含まれる原子間の結合長及び結合角が、幾らか変化できるからである。逆に、ペプチド結合粒子は剛体と想定されたので、粒子内の点 $C_i^{\alpha\text{c}}$ と点 $C_{i+1}^{\alpha\text{n}}$ の間の距離はシミュレーション中で変化できない。

以上の事から、筆者は、シミュレーション中において、点 $C_i^{\alpha\text{n}}$ と点 $C_i^{\alpha\text{c}}$ の座標は現実のペプチド結合平面が伸縮する程度に離れていても良いと考えた。この考えに基づくなら、拘束シミュレーションを実行する代わりに、次のようなシミュレーションを実行すればよい。即ちそれは、点 $C_i^{\alpha\text{n}}$ と点 $C_i^{\alpha\text{c}}$ の間に適切な束縛ポテンシャルを与えたシミュレーションである。

筆者はそのような束縛ポテンシャルを次の手順で設定した。まず、現実のペプチド結合平面の歪みが十分小さいときには、その平面に含まれる二つの C^α 原子は、とある自然長 l_0 及びとあるバネ定数 k' を持つバネで接続さ

れていると見なせると考えた。そして、このバネ定数 k' を分子力場 [56] を用いて算出し (詳細は S2)、結果として $k' = 125.02\text{J/m}^2$ という値を得た。最終的に、点 $\text{C}_i^{\alpha n}$ と点 $\text{C}_i^{\alpha c}$ の間に、自然長 0 及びバネ定数 $k^b = 125.02\text{J/m}^2$ を持つバネと見なせるような束縛ポテンシャルを与えた。

このように設定した束縛ポテンシャルはシミュレーション中で適切に働いた。その事は、S5 において検証した。本研究では、このような束縛ポテンシャルを採用する事により、拘束シミュレーションを回避し、さらに、現実のペプチド結合平面の伸縮性をシミュレーションに取り入れる事が出来た。

S1-4-3 ポテンシャル項 U^a

U^a は、結合した粒子間に作り出される C^α 原子周りの結合角 $\angle\text{NC}^\alpha\text{C}$ を束縛するポテンシャル項であり、次式で表した。

$$U^a = \sum_{i=1}^N U_i^a \quad (38)$$

ここで、 U_i^a は、 C_i^α 原子周りの結合角 $\theta_i = \angle\text{N}_i\text{C}_i^\alpha\text{C}_i$ を平衡角 θ_{eq} の周りに束縛するポテンシャル項であり、次式で表した。

$$U_i^a = \frac{k^a}{2} (\theta_i - \theta_{\text{eq}})^2 \quad (39)$$

ここで、 $k^a = 1.516 \times 10^{-18}\text{J/rad}^2$ ($k^a = 4.618 \times 10^{-22}\text{J/deg}^2$) 及び $\theta_{\text{eq}} = 110.1^\circ$ を用いた。 k^a の算出方法は、S2 に記述した。 θ_{eq} は、文献 [56] より得た。

S1-4-4 ポテンシャル項 U^{da}

U^{da} は、ポリペプチド鎖の二面角を束縛するポテンシャル項であり、次式で表した。

$$U^{\text{da}} = \sum_{i=1}^N U_i^{\text{da}} \quad (40)$$

ここで、 U_i^{da} は、ポリペプチド鎖の二面角 ϕ_i 及び ψ_i を束縛するポテンシャル項であり、一般的には次式で表される。

$$U_i^{\text{da}} = U_i^{\text{da}}(\phi_i, \psi_i) \quad (41)$$

本研究では、 i 番目のアミノ酸残基がプロリンである場合に限り、 ϕ_i に対して以下の束縛ポテンシャルを使用した。

$$U^{\text{da}} = \sum_{i=1}^N \left\{ \text{Pro}(i) \cdot \frac{k_\phi^{\text{Pro}}}{2} (\phi_i - \phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}})^2 \right\} \quad (42)$$

ここで、 $k_\phi^{\text{Pro}} = 1.077 \times 10^{-19}\text{J/rad}^2$ ($k_\phi^{\text{Pro}} = 3.281 \times 10^{-23}\text{J/deg}^2$) はポテンシャル定数である。 $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}} = -65.4^\circ$

は平衡二面角である。これらの値の算出方法は、S2 に記述した。 $\text{Pro}(i)$ は、 i 番目のアミノ酸がプロリンであるとき 1、それ以外のとき 0 を取る関数である。

S1-4-5 ポテンシャル項 U^{rep}

U^{rep} は、ポリペプチド鎖が互いに重なったり互いにすり抜けるような、非現実的な運動を防止するポテンシャル項であり、次式で表した。

$$U^{\text{rep}} = \sum_{i=0}^{N-3} \left(\sum_{j=i+3}^N U_{i,j}^{\text{rep}} \right) \quad (43)$$

ここで、 $U_{i,j}^{\text{rep}}$ は、粒子 i, j 間に働く斥力を表現するポテンシャル項であり、次式で表される。

$$U_{i,j}^{\text{rep}} = \begin{cases} \frac{k^{\text{rep}}}{2} (2r^{\text{rep}} - r_{i,j})^2 & (r_{i,j} < 2r^{\text{rep}}) \\ 0 & (2r^{\text{rep}} \leq r_{i,j}) \end{cases} \quad (44)$$

ここで、 $r_{i,j} = |\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i|$ は、粒子 i, j の中心間距離である。 $k^{\text{rep}} = 100\text{N/m}$ は、粒子間の斥力を表すポテンシャル定数である。 $r^{\text{rep}} = 0.2366\text{nm}$ は、ペプチド結合粒子の衝突半径を表す。 k^{rep} 及び r^{rep} の算出方法は、S2 に記述した。

本研究では、粒子 i に対して、粒子 $i-2, i-1, i+1, i+2$ のそれぞれは、 C^α 原子周りの結合角 $\angle\text{NC}^\alpha\text{C}$ を束縛するポテンシャル項の影響、並びに、粒子の剛体的性質によって、互いに非現実的な配置をとる事が無い。そのため、 $|i-j| = 0, 1, 2$ を満たす粒子 i, j の間には、斥力ポテンシャルを与えなかった。

S1-5 ポテンシャル項 U^{mem}

S1-5-1 U^{mem} のあらまし

U^{mem} は、アミノ酸残基と脂質膜との相互作用のうち、ポリペプチド鎖の構造に依存しない部分を表現するポテンシャル項である。具体的には、ポリペプチド鎖中に存在するアミノ酸残基を水中から脂質膜中へ輸送するとき生じる系の自由エネルギー変化を表現する。

S1-5-2 陰溶媒モデル

以下ではまず、ポテンシャル項 U^{mem} の考え方について、ポリペプチド鎖の代わりに小さな分子を用いて説明する。一般的に、脂質膜の内部は疎水的环境である。それ故、疎水性の分子は水中よりも膜中に存在する事を好む。親水性の分子は、その逆である。このような性質は、

分子を水中から脂質膜中へ輸送するとき生じる系の自由エネルギー変化量として定量化される。

実際のところ、とある溶質分子と脂質膜との相互作用は、溶質分子と水分子との相互作用、及び、溶質分子と脂質分子との相互作用との間の違いから生じる。この相互作用は、分子間相互作用を直接扱う代わりに、陰溶媒モデルを使用して表現する事が出来る。つまり、最初に、シミュレーション空間中に脂質膜が存在する領域を設定する。次に、この領域と溶質分子の位置関係によって変化するポテンシャル項を系全体のポテンシャルに加えるという事である。このポテンシャル項の変化量は、先述の自由エネルギー変化量を用いて定められる。

S1-5-3 ポリペプチド鎖と脂質膜との相互作用

本研究では、ポリペプチド鎖と脂質膜との相互作用を、陰溶媒モデルを用いてシミュレーションに取り入れた。ポリペプチド鎖の場合は、単純な低分子の場合と異なり、陰溶媒モデルの使用において以下の二種類の問題が生じる。

一方の問題は、アミノ酸残基と脂質膜との相互作用は、本来、ポリペプチド鎖の構造に依存するという事である。つまり、ポリペプチド鎖中に水素結合が形成されている場合、鎖中のアミノ酸残基は、そうでない場合に比べてより容易に膜中へ輸送できる。本研究では、この効果は、全て主鎖間の水素結合の相互作用を表現するポテンシャル項に押し込めた (S1-1-5 を見よ)。それ故、 U^{mem} は、ポリペプチド鎖の構造に関わらず、常に、ランダムコイル状態を想定した場合におけるアミノ酸残基と脂質膜との相互作用を表現する。

もう一方の問題は、ポリペプチド鎖を一つの溶質分子として扱う事は不適切であるという事である。なぜな

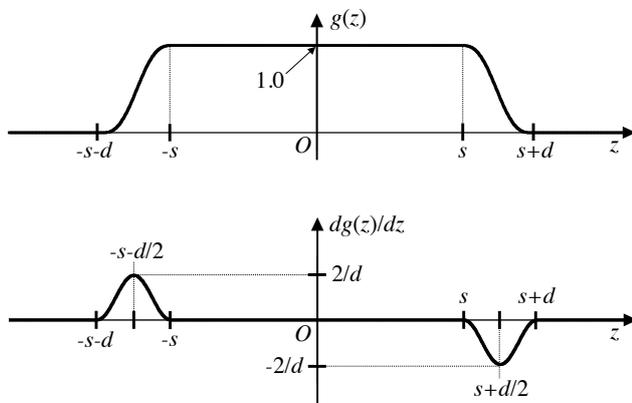


図 S1-2: 関数 $g(z)$ の概形 (上部) と、 $g(z)$ の導関数の概形 (下部)。横軸は z 座標軸、縦軸は $g(z)$ または $dg(z)/dz$ の値を表す。 s は、脂質膜の脂質コア領域の厚さの半分の長さを表す。 d は、膜界面領域の厚さを表す。本研究では、 $s = 1.4\text{nm}$ 及び $d = 0.7\text{nm}$ が用いられた。

ら、ポリペプチド鎖は巨大な分子であるからである。そこで、ポリペプチド鎖を側鎖、単位主鎖、N-及び C 末端という、小さな断片に分割して相互作用ポテンシャルを構築する。つまり、断片ごとに、脂質膜との相互作用ポテンシャルを定義し、 U^{mem} をそれらの和として表現した。

S1-5-4 では、とある断片と脂質膜との相互作用ポテンシャルについて説明する。S1-5-5 では、ポリペプチド鎖の断片への分割方法を説明する。加えて、それらの断片に対応するポリペプチド鎖の粗視化モデル上での座標を用いて、 U^{mem} を具体的に記述する。

S1-5-4 断片と脂質膜との相互作用

本研究では、ポリペプチド鎖中の一つの分子断片 $frag$ と脂質膜との間の相互作用を、以下のように記述した。まず、脂質膜は、その膜中面が xy 平面と一致するように配置していると想定する。そして、想定した脂質膜領域と断片 $frag$ との位置関係によって変化するポテンシャル項 U_f を、この断片を代表する z 座標 z_f の関数として、次式で表した。

$$U_f(z_f) = U_f^w + (U_f^m - U_f^w) \cdot g(z_f) \quad (45)$$

ここで、 U_f^w 及び U_f^m は、それぞれ、断片 $frag$ が完全な水中及び完全な膜中に存在するときのポテンシャルである。 z 座標の関数 $g(z)$ の値は、脂質コア領域 ($|z| < 1.4\text{nm}$) で 1、水領域 ($2.1\text{nm} \leq |z|$) で 0 をとり、膜界面でその間を滑らかに変化する。

より具体的に、 $g(z)$ は次式で表現される。

$$g(z) = \begin{cases} 0 & (s + d \leq |z|) \\ \frac{1}{2} - z_c - \frac{1}{2\pi} \sin(2\pi z_c) & (s < |z| < s + d) \\ 1 & (|z| \leq s) \end{cases} \quad (46)$$

ここで、 $s = 1.4\text{nm}$ は、脂質コア領域の厚さの半分を表す。 $d = 0.7\text{nm}$ は、膜界面領域の厚さを表す。また、 $z_c = (|z| - s - d/2)/d$ である。この関数は、水領域及び脂質コア領域で定数となり、膜界面領域で単調かつ滑らかであり、全領域で二回微分可能である。 $g(z)$ の形状は、図 S1-2 に示した。

式 (45) の定数項 U_f^w は、シミュレーションに直接関与しない。そこで、本研究では式 (45) の代わりに、次の表式を使用する。

$$U_f(z_f) = \Delta U_f \cdot g(z_f) \quad (47)$$

ここで、

$$\Delta U_f = U_f^m - U_f^w \quad (48)$$

である。

S1-5-6 U^{mem} の具体的な表式

本研究では、ポリペプチド鎖中の各アミノ酸残基の側鎖 (-R) をそれぞれ一つの断片とした。そして、 i 番目のアミノ酸残基の側鎖と脂質膜との相互作用ポテンシャル U_i^{sc} を、粗視化モデル上で対応する i 番目の C^α 原子に与えた。即ち、 U_i^{sc} を、 i 番目の C^α 原子の z 座標 z_i^α の関数として次式で表した。

$$U_i^{\text{sc}}(z_i^\alpha) = \Delta U_i^{\text{sc}} \cdot g(z_i^\alpha) \quad (49)$$

ΔU_i^{sc} は、 i 番目のアミノ酸の側鎖の種類に応じて定まる定数である。

また、本研究では、ポリペプチド鎖中の主鎖のうち、 $\frac{1}{2}\text{C}^\alpha\text{-CONH-}\frac{1}{2}\text{C}^\alpha$ の部分を、一つの断片とした。以下では、これを主鎖の単位断片と呼ぶ。 $\frac{1}{2}\text{C}^\alpha$ は、 C^α 原子の半分を意味する。 i 番目と $i+1$ 番目のアミノ酸残基の間的主鎖の単位断片と膜との相互作用ポテンシャル U_i^{mc} は、モデル上で対応する i 番目のペプチド結合粒子の中心に与えた。即ち、 U_i^{mc} を、 i 番目の粒子の中心の z 座標、 z_i の関数として、次式で表した。

$$U_i^{\text{mc}}(z_i) = \Delta U_i^{\text{mc}} \cdot g(z_i) \quad (50)$$

ここで、 ΔU_i^{mc} は、N 末端及び C 末端を表す粒子を除き、全て同一の値、 $\Delta U_i^{\text{mc}} = \Delta U^{\text{pb}}$ とした。また、ポリペプチド鎖中の N 末端 ($\frac{1}{2}\text{C}^\alpha\text{-NH}_2$) 及び C 末端 ($\frac{1}{2}\text{C}^\alpha\text{-COOH}$) の部分を、それぞれ一つの断片とした。そして、これら N 末端及び C 末端の断片と脂質膜との相互作用ポテンシャルは、主鎖の単位断片の場合と同様にして、それぞれ、0 番目及び N 番目の粒子の中心に与えられた。即ち、式 (50) において、 $\Delta U_0^{\text{mc}} = \Delta U^{\text{Nterm}}$ 及び $\Delta U_N^{\text{mc}} = \Delta U^{\text{Cterm}}$ であるとする。

最終的に、 U^{mem} は、次式で表される。

$$U^{\text{mem}} = \sum_{i=1}^N U_i^{\text{sc}}(z_i^\alpha) + \sum_{i=0}^N U_i^{\text{mc}}(z_i) \quad (51)$$

式 (49) で使用された ΔU_i^{sc} の定数値、並びに、式 (50) で使用された ΔU^{pb} 、 ΔU^{Nterm} 、及び ΔU^{Cterm} の定数値は、本文中の表 2 に掲載した。また、それらの算出方法は、S2 に記載した。

S1-6 ポテンシャル項 U^{hb}

S1-6-1 ポテンシャル項 U^{hb} のあらまし

U^{hb} は、ポリペプチド鎖に α ヘリックス構造を形成させる相互作用を表現するポテンシャル項である。具体的には、主鎖間の水素結合を表現する。本研究では、脂質膜中で水素結合が形成されるときポテンシャル低下量を、水中の場合と比べて、より大きな値に設定した。この事によって、ポリペプチド鎖は水中よりも脂質膜中においてより α ヘリックス構造を形成しやすいという性質が、シミュレーションに反映される。加えて、ポリペプチド鎖が α ヘリックスを形成すると脂質膜内により輸送され易くなるという効果も、シミュレーションに自然に取り入れられる。

S1-6-2 水素結合の表現方法の考え方

ポリペプチド鎖が α ヘリックス構造を形成するときには、必ず主鎖間の水素結合が形成される。実際のところ、 α ヘリックス構造の形成には様々な相互作用が関与しているけれども、主鎖間の水素結合の効果は最も大きいと考えられる。そこで本研究では、ポリペプチド鎖が α ヘリックスを形成するという性質を、主鎖間の水素結合相互作用として、表現しようと考えた。

本研究では、ポリペプチド鎖を粗視化モデルによって表現する。また、本研究では、計算量の小さなシミュレーション系を開発する事も非常に重要である。それ故、それらの条件を満たしつつ、的確に主鎖間の水素結合相互作用を取り入れる工夫が必要となる。本研究では以下の二つの工夫を行った。

一つ目は、考慮する主鎖間の水素結合を限定する事である。実際の α ヘリックス構造では、 i 番目のアミノ酸残基の α カルボキシル基の $\text{C}=\text{O}$ と、 $i+4$ 番目のアミノ酸残基の α アミノ基の H-N が、水素結合 $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H-N}$ (以下では、 i 番目の水素結合と呼ぶ) を形成している。本研究では、このような主鎖間の水素結合のみをシミュレーションに取り入れた。

二つ目は、水素結合を表現する為に、本研究の粗視化モデルに適したポテンシャルを使用する事である。本研究では、ペプチド結合粒子上に配置した二種類の結合点の間に引力ポテンシャルを与える事で、水素結合の相互作用を表現する。二種類の結合点のうち、一方は、hbo 点であり、粒子上の酸素原子点の近傍に配置した。もう一方は、hbh 点であり、粒子上の水素原子点の近傍に配置した (本文中の図 1 を見よ)。 i 番目の粒子上に配置した hbo 点及び hbh 点を、それぞれ、 hbo_i 及び hbh_{i+1} で表す。粒子上での hbo 点と hbh 点の座標は、ポリペプチド鎖の粗視化モデルが理想的な α ヘリックス構造を形成したときに、 hbo_i と hbh_{i+4} の座標がシミュレーション空間中で一致するように定めた (図 S1-3 を見よ)。その

詳細は、S1-6-3に記述した。そして、 i 番目の水素結合 ($C_iO_i \cdots H_{i+4}N_{i+4}$) の相互作用を、 hbo_i と hbh_{i+4} が接近すると値が低下するようなポテンシャル項 U_i^{hb} として、シミュレーションに取り入れた。その詳細は、S1-6-4に記述した。以下では、 hbo_i と hbh_{i+4} の間の引力ポテンシャルの事も、 i 番目の水素結合と呼ぶ。

S1-6-3 水素結合点の配置

水素結合を形成している C=O 基と H-N 基は、最も安定な結合距離を超えて接近すると、急激に反発し合う。それ故、シミュレーション中で主鎖間の水素結合を表現する為には、引力ポテンシャルだけでなく、そのような斥力ポテンシャルを取り入れる必要がある。一方、本研究では、シミュレーション中でポリペプチド鎖が重なる事を防止する為に、ペプチド結合粒子間に斥力ポテンシャルを与える。そこで本研究では、ポリペプチド鎖の重なりを防止する斥力ポテンシャルを、水素結合相互作用の斥力部分を表現する為にも使用した。

この為に、ペプチド結合粒子に固定された座標系における hbo 点及び hbh 点の座標 (即ち、 \hat{r}^{hbo} 及び \hat{r}^{hbh})、

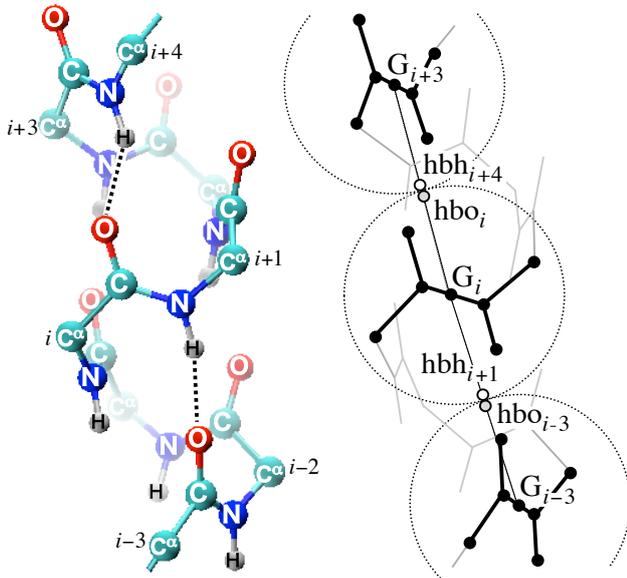


図 S1-3: α ヘリックス構造 ($\phi, \psi = (-60^\circ, -45^\circ)$) を形成しているポリペプチド鎖の主鎖を原子モデルで表現したもの (左図)。左図のポリペプチド鎖の構造を、ペプチド結合粒子モデルで表現したもの (右図)。 $i-3, i, i+3$ 番目のペプチド結合粒子の内部構造を黒実線で表し、それ以外の粒子の内部構造は灰色の実線で表した。 G_i は、 i 番目の粒子の中心を表す。 G_i を中心とした点線の円は、 i 番目の粒子の衝突半径を表す。 hbo_i は、水素結合を表現する為の結合点であり、 i 番目の粒子上に配置されており、 i 番目の残基の α カルボキシル基に含まれる酸素原子の近傍に位置する。 hbo_{i+1} は、水素結合を表現する為の結合点であり、 i 番目の粒子上に配置されており、 $i+1$ 番目の残基の α アミノ基に含まれる水素原子の近傍に位置する。ポリペプチド鎖が α ヘリックス構造を形成している場合、 i 番目の粒子上にある hbo_i 結合点の位置と、 $i+3$ 番目の粒子上にある hbh_{i+4} 結合点の位置は、互いに一致する。

並びに、ペプチド結合粒子の衝突半径 r^{rep} を、次の条件を満たすように定めた。

条件 A

ポリペプチド鎖の粗視化モデルが理想的な α ヘリックス構造を形成したとき、 i 番目と $i+3$ 番目のペプチド結合粒子間の距離は $2r^{rep}$ となる。このとき、 hbo_i と hbh_{i+4} のシミュレーション空間中での座標 (それぞれ、 r_i^{hbo} 及び r_{i+4}^{hbh}) は、 i 番目と $i+3$ 番目のペプチド結合粒子の midpoint で一致する。

条件を満たす \hat{r}^{hbo} 及び \hat{r}^{hbh} 、並びに、 r^{rep} は、以下の手順で算出した。まず、ポリペプチド鎖の粗視化モデルが理想的な右巻きの α ヘリックス構造を形成するように、即ち、全ての i について以下の三つの式を満たすように、粒子をシミュレーション空間中に配置した (図 S1-3)。

$$r_i^{\alpha n} = r_i^{\alpha c} \quad (52)$$

$$\theta_i = 110.1^\circ \quad (53)$$

$$(\phi_i, \psi_i) = (-60^\circ, -45^\circ) \quad (54)$$

式 (52) は、同一の C^α 原子を表す二つの座標がシミュレーション空間中で一致する事を要請する。式 (53) 及び式 (54) は、それぞれ、 θ_i 及び (ϕ_i, ψ_i) が、理想的な α ヘリックス中に見出される値となる事を要請する。この結果、 $r^{rep} = 0.2366\text{nm}$ と定められた。また、 \hat{r}^{hbo} 及び \hat{r}^{hbh} は、以下の方程式を解いて求めた。

$$\frac{1}{2}(r_i + r_{i+3}) = A_i \hat{r}^{hbo} + r_i \quad (55)$$

$$\frac{1}{2}(r_i + r_{i+3}) = A_{i+3} \hat{r}^{hbh} + r_{i+3} \quad (56)$$

この結果として、 hbo 及び hbh の両結合点は、粒子に固定された座標系の原点を中心とした半径 r^{rep} の球の表面に位置する事になる (本文中の図 1 を見よ)。算出した \hat{r}^{hbo} 及び \hat{r}^{hbh} の座標は、本文中の表 2 に記載した。

S1-6-4 水素結合ポテンシャルの表式

本研究では、 i 番目の水素結合相互作用を表現するポテンシャル項 U_i^{hb} を、次式のように記述した。

$$U_i^{hb}(z_i^{hb}, r_i^{hb}) = \Delta U^{hb,w} \cdot h(r_i^{hb}) + (\Delta U^{hb,m} - \Delta U^{hb,w}) \cdot g(z_i^{hb}) \cdot h(r_i^{hb}) \quad (57)$$

ここで、 z_i^{hb} は、 hbo_i と hbh_{i+4} の midpoint の z 座標であり、次式で算出する。

$$z_i^{hb} = \frac{1}{2}(r_i^{hbo} + r_{i+4}^{hbh}) \cdot z \quad (58)$$

また、 r_i^{hb} は、 hbo_i 及び hbh_{i+4} の二点の間の距離であり、次式で算出する。

$$r_i^{\text{hb}} = |r_i^{\text{hbo}} - r_{i+4}^{\text{hbh}}| \quad (59)$$

また、 $U^{\text{hb,w}} = -8.726\text{kJ/mol}$ 、そして、 $\Delta U^{\text{hb,m}} = -24.93\text{kJ/mol}$ を使用した。式中の $h(r)$ は、次式で定義した。

$$h(r) = \begin{cases} -3\left(\frac{r}{r_0}\right)^4 + 8\left(\frac{r}{r_0}\right)^3 - 6\left(\frac{r}{r_0}\right)^2 + 1 & (r < r_0) \\ 0 & (r_0 \leq r) \end{cases} \quad (60)$$

ここで、 $r_0 = 0.25\text{nm}$ とした。 $h(r)$ の外形は図 S1-4 に示した。式中の $g(z)$ は、ポリペプチド鎖の断片と膜との相互作用を表現する為に用いた関数と同一である。ここでも、 $g(z)$ 中において、脂質コア領域の厚さの半分を表す $s = 1.4\text{nm}$ 、及び、膜界面領域の厚さを表す $d = 0.7\text{nm}$ を使用した。 $U^{\text{hb,w}}$ 、 $\Delta U^{\text{hb,m}}$ 、及び、 r_0 の値の算出方法は、S2 に詳しく記述した。

式 (57) の右辺第一項目は、水中での水素結合相互作用を表現している。第一項目の値は、 r_i^{hbo} と r_{i+4}^{hbh} の二点が互いに接近すると減少する。

式 (57) の右辺第二項目は、水中での水素結合相互作用と、脂質膜中でのそれとの間の違いを表現している。つまり、脂質膜中での水素結合の形成に伴う系のポテンシャルの低下は、第一項目と第二項目の和として表される。

$U_i^{\text{hb}}(z_i^{\text{hb}}, r_i^{\text{hb}})$ が作る曲面の形状、及び、脂質膜領域との関係は、図 S1-5 に描画した。シミュレーション中において i 番目の水素結合が完全に形成されたとき、即ち、 r_i^{hbo} と r_{i+4}^{hbh} が脂質膜中で一致したとき、 $g(z_i^{\text{hb}}) = 1$ 、そして、 $h(r_i^{\text{hb}}) = 1$ となり、 $U_i^{\text{hb}}(z_i^{\text{hb}}, r_i^{\text{hb}}) = \Delta U^{\text{hb,m}}$ となる。

最終的に、ポリペプチド鎖中の主鎖間の水素結合を表

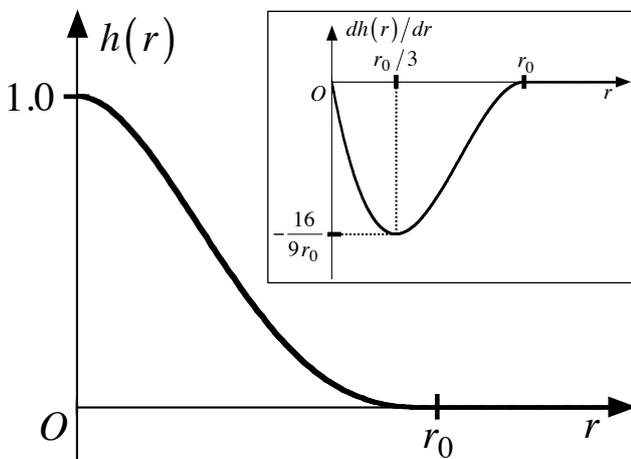


図 S1-4: 関数 $h(r)$ の概形、及び、 $h(r)$ の導関数の概形 (右)。 $h(r)$ の定義域は、 $0 \leq r$ である。

すポテンシャル項 U^{hb} は、次式で記述した。

$$U^{\text{hb}} = \sum_{i=1}^{N-4} \{U_i^{\text{hb}}(z_i^{\text{hb}}, r_i^{\text{hb}}) \cdot \bar{P}(i)\} \quad (61)$$

ここで、 $\bar{P}(i)$ は、 $i+4$ 番目のアミノ酸がプロリンであるとき 0、そうでなければ 1 をとる関数であり、プロリン残基の主鎖の N 原子が水素結合に参加できない事を表現する。

S1-6-5 その他

本研究では、予め理想的な右巻きの α ヘリックス構造を想定した上で、この構造が最も安定となるように r^{hbo} 及び r^{hbh} の座標、並びに、ポテンシャル関数を設定した。それ故、左巻きの α ヘリックスの形成は、結果として考慮されていない。

また、図 S1-5 から、次の事が分かる。それは、主鎖中の C=O 基と H-N 基を水中から脂質膜中へ輸送する事は、それらが水素結合を形成していない場合 ($r_0 \leq r_i^{\text{hb}}$) よりも、形成している場合 ($r_i^{\text{hb}} < r_0$) の方が、より容易に行えるという事である。この事は、 α ヘリックス構造を形成しているポリペプチド鎖の方が、ランダムコイル状態にあるポリペプチド鎖よりも、水中から膜中へより容易に輸送出来るという現象が、シミュレーション中に取り入れられているという事を意味する。

S1-7 ポテンシャル項 U^{cl}

U^{cl} はカンチレバーのたわみエネルギーを表すポテンシャル項である。

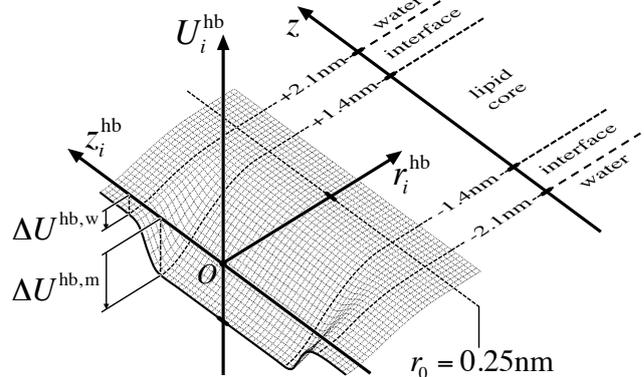


図 S1-5: 水素結合ポテンシャル曲面。 U_i^{hb} は、結合点 hbo_i と結合点 hbh_{i+4} の間に形成される i 番目の水素結合の相互作用ポテンシャルを表現する。 U_i^{hb} は、 hbo_i と hbh_{i+4} の間の距離である r_i^{hb} と、 hbo_i と hbh_{i+4} の中点の z 座標である z_i^{hb} の関数である。 $0.25\text{nm} \leq r_i^{\text{hb}}$ であるとき、 $U_i^{\text{hb}} = 0$ となる。 z_i^{hb} が水中 ($2.1\text{nm} \leq |z_i^{\text{hb}}|$) であり、 $r_i^{\text{hb}} = 0$ であるとき、 $U_i^{\text{hb}} = \Delta U^{\text{hb,w}}$ となる。 z_i^{hb} が脂質コア領域 ($|z_i^{\text{hb}}| \leq 1.4\text{nm}$) であり、 $r_i^{\text{hb}} = 0$ であるとき、 $U_i^{\text{hb}} = \Delta U^{\text{hb,m}}$ となる。

AFMの基板に付着している膜とカンチレバーの間をポリペプチド鎖が架橋している場合、膜とカンチレバーを引き離すとそのポリペプチド鎖は引き延され張力が発生する。この張力に応じて、カンチレバーはたわむ。膜タンパク質の強制アンフォールディング実験では、このたわみ量を計測する事によって、ポリペプチド鎖の張力を導出している。

本研究では、カンチレバーの根元に対応する点(その座標を $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ とする)とカンチレバーの針先に対応する点(その座標を $\mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}}$ とする)という二つの点を用いて、カンチレバーを表現した。カンチレバーがたわむ効果は、それら二点の間のポテンシャル U^{cl} として表現した。

シミュレーション中では、カンチレバーの針先に対応する点の座標を、その針先に付着しているペプチド結合粒子の座標に常に一致させた。即ち、膜タンパク質を N 末端側から引き抜く場合には、 N 末端を表す 0 番目の粒子の座標 \mathbf{r}_0 を $\mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}}$ として使用した。C 末端側から引き抜く場合では、C 末端を表す N 番目の粒子の座標 \mathbf{r}_N を $\mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}}$ として使用した。また、強制アンフォールディングシミュレーションでは、 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ を z 軸の方向へ一定速度で移動させる事で、カンチレバーを脂質膜から引き離す事を表現する。

U^{cl} は、次式で表した。

$$U^{\text{cl}} = \frac{1}{2}k_x^{\text{cl}}(x_{\text{bh}}^{\text{cl}})^2 + \frac{1}{2}k_y^{\text{cl}}(y_{\text{bh}}^{\text{cl}})^2 + \frac{1}{2}k_z^{\text{cl}}(z_{\text{bh}}^{\text{cl}})^2 \quad (62)$$

ここで、 $\mathbf{r}_{\text{bh}}^{\text{cl}} = \mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}} - \mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ であり、 $x_{\text{bh}}^{\text{cl}}, y_{\text{bh}}^{\text{cl}}, z_{\text{bh}}^{\text{cl}}$ は、それぞれ、 $\mathbf{r}_{\text{bh}}^{\text{cl}}$ の x, y, z 成分である。本研究では、 $k_x^{\text{cl}} = k_y^{\text{cl}} = 50.0\text{N/m}$ を使用した。この値は、 $\mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}}$ の $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ に対する x 及び y 方向の変異が十分小さくなるように定めた。また、本研究では、 $k_z^{\text{cl}} = 0.1\text{N/m}$ を使用した。この値は、実験において典型的に用いられるカンチレバーのバネ定数 [9] として定めた。

S1-8 ポテンシャル項 U^{wall}

U^{wall} は、ポリペプチド鎖が脂質膜中において移動できる領域を制限する為のポテンシャル項である。

本研究では、ペプチド結合粒子間の重なりを妨げる斥力的ポテンシャルを除き、膜貫通ヘリックス間に働く相互作用を用いない。それ故、膜貫通ヘリックスがシミュレーション中で互いに会合して三次構造を形成する事は無い。その結果として、膜貫通ヘリックスが脂質膜中において移動できる範囲を制限する必要が生じる。もしそうしなければ、膜貫通ヘリックスは、それらを結合する膜外ループの長さが許す範囲に置いて脂質膜中を横方向に広く拡散してしまう。そこで、本研究ではこのようなヘリックスの拡散を防ぐ為に、以下の事を行った。

まず、シミュレーション空間中においてペプチド結合粒子の侵入を制限する領域 D を設定した。この領域は、 $2.0\text{nm} \leq \sqrt{x^2 + y^2}$ かつ $-2.5\text{nm} \leq z \leq 2.5\text{nm}$ を満たす領域、及び、 $z \leq -3.5\text{nm}$ を満たす領域とした。前者の領域は、膜貫通ヘリックスの無制限な拡散を防止する為に設けた。後者の領域は、実験における AFM の基板を表現する。領域 D は、本文中の図 4 に図示した。

次に、 U^{wall} を次式で表した。

$$U^{\text{wall}} = \sum_{i=0}^N U_i^{\text{wall}} \quad (63)$$

ここで、 U_i^{wall} は、粒子 i が領域 D に侵入する事を制限するポテンシャル項であり、次式で表した。

$$U_i^{\text{wall}} = \begin{cases} \frac{k^{\text{wall}}}{2} (r^{\text{wall}} - |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^{\text{d}}|)^2 & (|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^{\text{d}}| < r^{\text{wall}}) \\ 0 & (r^{\text{wall}} \leq |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^{\text{d}}|) \end{cases} \quad (64)$$

ここで、 $r^{\text{wall}} = 0.2366\text{nm}$ は、壁に対する粒子の衝突半径である。 $k^{\text{wall}} = 100\text{N/m}$ は、領域 D と粒子の間に働く斥力を表現するポテンシャル定数である。 r^{wall} 及び k^{wall} の値は、それぞれ、ポテンシャル項 U^{rep} の r^{rep} 及び k^{rep} と同じ値に設定した。 \mathbf{r}_i^{d} は、領域 D に含まれ、且つ、最も粒子 i の位置 \mathbf{r}_i に近い点の座標を表す。この結果として、領域 D の表面は、ポリペプチド鎖を構成する粒子に対して壁のような役割を果たす。

S2 ポテンシャル定数の算出

S2-1 ポリペプチド鎖内部のポテンシャル定数

S2-1-1 概説

S2-1 では、ポリペプチド鎖の内部に与えたポテンシャル中で用いられる定数の算出方法について説明する。 k^{b} については S2-1-2 に、 k^{a} 及び θ_{eq} については S2-1-3 に、 k_{ϕ}^{Pro} 及び $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}$ については S2-1-4 に記述した。 r^{rep} は、S1-6 において既に定めてある。 k^{rep} は、水素結合の斥力部分を表現する事を兼ねる為に、S2-3 において定める。

S2-1-2 ポテンシャル定数 k^{b} の算出

本研究では、多数のペプチド結合粒子を直鎖状に繋がれたものとして、ポリペプチド鎖を表現する。粒子が直鎖状に繋がった状態を保つ為には、粒子 $i-1$ 上にある C_i^{an} 点の座標 \mathbf{r}_i^{an} と、粒子 i 上にある C_i^{ac} 点の座標 \mathbf{r}_i^{ac} の間の距離 $r_i^{\text{an,ac}} = |\mathbf{r}_i^{\text{ac}} - \mathbf{r}_i^{\text{an}}|$ を、シミュレーション中で常

に殆ど0に保つ必要がある。この事を実現する為、拘束ポテンシャル $U_i^b = (k^b/2)(r_i^{\alpha n, \alpha c})^2$ を用いる。そこで、 k^b としてどのような値を設定すれば良いかという事が、問題となる。

本研究では、ペプチド結合平面の伸縮性を基にして、 k^b の値を定めた。現実のポリペプチド主鎖中のペプチド結合平面（即ち、 C^α -CONH- $C^{\alpha'}$ の部分）に含まれる原子間の結合長及び結合角は、幾らか変化できる。変化量が微小であるならば、ペプチド結合平面の変形によって生じるエネルギー U は、次式で記述できるだろう。

$$U = \frac{k}{2}(r - r_{eq})^2 \quad (65)$$

ここで、 r は C^α と $C^{\alpha'}$ の間の距離であり、 r_{eq} は r の平衡距離である。本研究では、 k^b の値を式 (65) の定数 k の値として定義した。

定数 k の値は、以下の手順で算出した。 C^α -CONH- $C^{\alpha'}$ の部分に含まれる6つの原子を、図 S2-1 のように座標系上に配置した。さらに、 C^α 原子の位置を座標系の原点に固定した。 $C^{\alpha'}$ 原子の位置は x 軸上を、そして、C, O, N, H 原子は xy 平面内を移動できるとした。

C^α -CONH- $C^{\alpha'}$ の部分のポテンシャルを次式で表した。

$$\tilde{U} = \sum_{b \in B} U_b^{\text{bond}} + \sum_{a \in A} U_a^{\text{angle}} \quad (66)$$

ここで、右辺第一項目は、共有結合している原子対の結合長に関するポテンシャルエネルギーの総和を表す。 B は、原子対の集合であり、次式で表した。

$$B = \{(C^\alpha, C), (C, O), (C, N), (N, H), (N, C^{\alpha'})\} \quad (67)$$

右辺第二項目は、結合角に関するポテンシャルエネルギーの総和を表す。 A は、結合角を定義できる3つの原

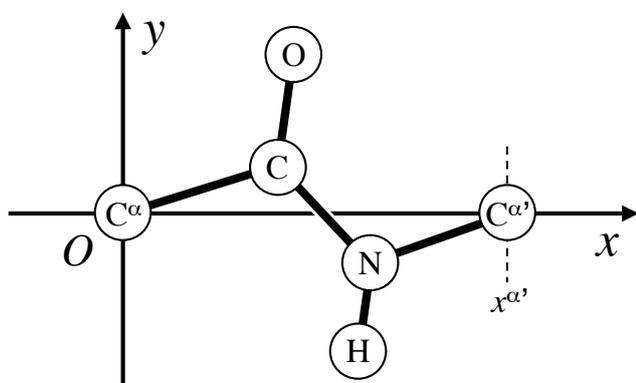


図 S2-1: ペプチド結合平面の伸縮性を産出する為の原子の配置。 C^α 原子の位置は座標系の原点に固定されており、 $C^{\alpha'}$ 原子は x 軸上をのみを移動でき、H, N, C, O 原子は xy -平面内のみを移動できると想定した。 $x^{\alpha'}$ は、 $C^{\alpha'}$ 原子の x 座標を表す。

子の組の集合であり、次式で表した。

$$A = \{(C^\alpha, C, O), (C^\alpha, C, N), (O, C, N), (C, N, H), (C, N, C^{\alpha'}), (H, N, C^{\alpha'})\} \quad (68)$$

U_b^{bond} 及び U_a^{angle} の計算には、文献 [56] の力場を使用した。

$C^{\alpha'}$ 原子の x 座標が $x^{\alpha'}$ であるときの系の力学的な平衡状態に置ける \tilde{U} の値を、 $\tilde{U}(x^{\alpha'})$ で表す。筆者は、様々な $x^{\alpha'}$ での $\tilde{U}(x^{\alpha'})$ の値を数値計算によって求めた。そして、その結果を $x_{eq} - 0.05\text{nm} \leq x^{\alpha'} \leq x_{eq} + 0.05\text{nm}$ の範囲において、式 (65) でフィッティングした (図 S2-2)。その結果、 $k = 125.02\text{J/m}^2$ が得られた。本研究ではこの値を k^b として使用する。

S2-1-3 ポテンシャル定数 k^a 及び θ_{eq} の算出

現実のポリペプチド鎖では、原子間結合角 $\angle N_i C_i^\alpha C_i$ は、 110° 付近に拘束されている。本研究では、この事を次のようにしてポリペプチド主鎖の粗視化モデルに取り入れた。即ち、 $r_i^N - r_i^{\alpha n}$ と $r_i^C - r_i^{\alpha c}$ の二つのベクトルの成す角 θ_i を、 $\theta_{eq} = 110^\circ$ 付近に拘束ポテンシャル $U_i^a = (k^a/2)(\theta_i - \theta_{eq})^2$ を用いて拘束した。ここで、ポテンシャル定数 k^a を決定する必要がある。

筆者は、現実のポリペプチド鎖中の一つの C^α 原子と、この C^α 原子に共有結合した N, H, C^β , C の、合わせて5つの原子から構成される部分に注目した。この部分の原子間結合角 $\theta = \angle NC^\alpha C$ が力学的な平衡状態 θ_{eq} に近いとき、この部分の変形エネルギーは次式で表されるだろう。

$$U_\theta = \frac{k}{2}(\theta - \theta_{eq})^2 \quad (69)$$

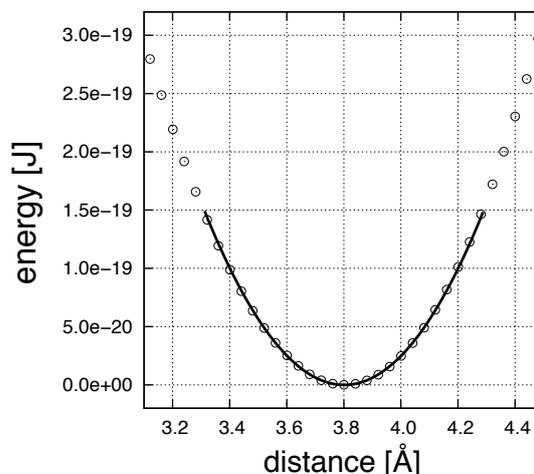


図 S2-2: ペプチド結合平面の歪み量と歪みエネルギーの関係。横軸は C^α 原子と $C^{\alpha'}$ 原子の間の距離を表し、縦軸はペプチド結合平面の歪みエネルギーを表す。白丸印は計算結果を表し、黒実線はフィッティング曲線を表す。

本研究では、式 (69) の k を文献 [56] の力場を用いて算出し、 k^b として使用する。

k の値は、以下の手順で算出した。まず、それら 5 つの原子から構成される部分を、座標系上に図 S2-3 のように配置した。そして、N 原子を座標系の原点に固定した。C 原子は x 軸上を、 C^α 原子は xy 平面中を移動できるとした。以下では、C 原子の x 座標を x^C で表す。

この部分系の変形エネルギーを次式で表した。

$$\tilde{U} = \sum_{b \in B} U_b^{\text{bond}} + \sum_{a \in A} U_a^{\text{angle}} \quad (70)$$

ここで、式 (70) の内容は式 (66) と同様である。ただし、集合 B 及び A は、以下であるとする。

$$B = \{(N, C^\alpha), (C^\beta, C^\alpha), (H, C^\alpha), (C, C^\alpha)\} \quad (71)$$

$$A = \{(N, C^\alpha, C), (N, C^\alpha, C^\beta), (N, C^\alpha, H), (C^\beta, C^\alpha, C), (C^\beta, C^\alpha, H), (H, C^\alpha, C)\} \quad (72)$$

筆者は、様々な x^C において、その条件の下での系の力学的な平衡状態における \tilde{U} と θ を算出した。そして、その結果を $100^\circ \leq \theta \leq 120^\circ$ の範囲において、 θ と \tilde{U} の関係を式 (65) でフィッティングした (図 S2-4)。その結果、 $k = 1.516 \times 10^{-18} \text{J/rad}^2$ を得た。本研究ではこの値を k^a として使用する。

S2-1-4 ポテンシャル定数 k_ϕ^{Pro} 及び $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}$ の算出

プロリンの側鎖の C^δ 原子はその主鎖の N 原子と結合しているため、プロリン残基の二面角 ϕ は制限された範囲のみで変化できる。本研究では、この事を次のようにしてシミュレーションに取り入れた。即ち、 i 番目のア

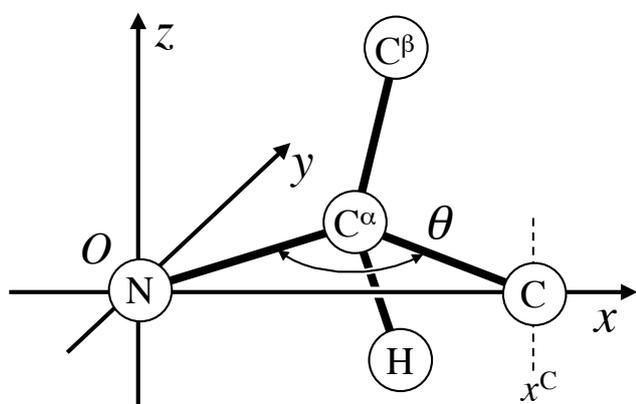


図 S2-3: ポリペプチド鎖中の原子間結合角 $\theta = \angle \text{NC}^\alpha \text{C}$ を拘束するポテンシャルに含まれる復元力定数 k^b を算出する為の原子の配置。N 原子の位置は座標系の原点に固定されており、C 原子は x 軸上をのみを移動でき、 C^α 原子は xy -平面内のみを移動できると想定した。 x^C は C 原子の x 座標を表す。

ミノ酸残基がプロリンである場合に、 ϕ_i を次式で表されるポテンシャルを用いて拘束した。

$$U^{\text{Pro}}(\phi_i) = \frac{k_\phi^{\text{Pro}}}{2} (\phi_i - \phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}})^2 \quad (73)$$

ここで、 k_ϕ^{Pro} は拘束の強さを表す定数であり、 $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}$ は平衡二面角である。この式を使う為には、 k_ϕ^{Pro} 及び $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}$ の値を決定する必要がある。

Morris 等は、多数の立体構造を観察し、プロリン残基の二面角 ϕ の分布が概ね $\phi = -65.4^\circ \pm 11.2^\circ$ (平均値 \pm 標準偏差) のガウス分布となっている事を報告した [57]。本研究ではこの報告を元に、 k_ϕ^{Pro} 及び $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}$ を以下の手順で算出した。まず、Morris の報告より、 $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}} = -65.4^\circ$ とした。次に、Morris の報告した分布を、プロリン残基の二面角 ϕ の拘束ポテンシャルから作られたボルツマン分布であると見なした。Morris の報告した分布は、本来、タンパク質内のアミノ酸残基の間の相互作用の結果として生じたものであるが、この事実には目をつむった。そして、シミュレーションにおける拘束ポテンシャル $U^{\text{Pro}}(\phi_i)$ が与える ϕ_i のボルツマン分布が Morris の報告した分布と一致するように、 k_ϕ^{Pro} の値を定めた。

$U^{\text{Pro}}(\phi)$ が与える ϕ のボルツマン分布は、次式で表される。

$$\rho(\phi) = \exp \left\{ -\frac{k_\phi^{\text{Pro}}}{2k_b T} (\phi - \phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}})^2 \right\} \quad (74)$$

また、平均 $\phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}$ 、標準偏差 σ の正規分布関数は次式で表される。

$$f(\phi) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp \left\{ -\frac{1}{2\sigma^2} (\phi - \phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}})^2 \right\} \quad (75)$$

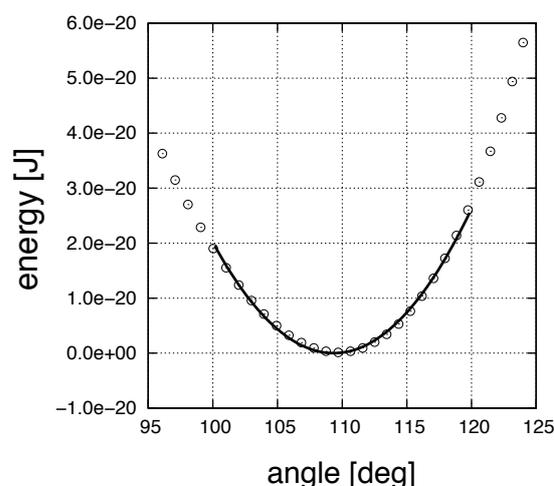


図 S2-4: アミノ酸残基の一部分 (図 S2-3 に図示) の歪み量と歪みエネルギーの関係。横軸は原子間結合角 $\angle \text{NC}^\alpha \text{C}$ を表し、縦軸は歪みエネルギーを表す。白丸印は計算値を表し、黒実線はフィッティング曲線を表す。

ここで、 $\rho(\phi)\propto f(\phi)$ の関係を想定すると、次式が得られる。

$$k_{\phi}^{\text{Pro}} = \frac{k_b T}{\sigma^2} \quad (76)$$

この式に $\sigma = 11.2^\circ$ を代入すると、次の結果が得られる。

$$k_{\phi}^{\text{Pro}} = 1.077 \times 10^{-19} \text{ J/rad}^2 \quad (77)$$

S2-2 $\Delta U_i^{\text{sc}}, \Delta U^{\text{pb}}, \Delta U^{\text{Nterm}}, \Delta U^{\text{Cterm}}$ の値の決定

S2-2-1 概要

S2-2 では、ポテンシャル定数 $\Delta U_i^{\text{sc}}, \Delta U^{\text{pb}}, \Delta U^{\text{Nterm}}, \Delta U^{\text{Cterm}}$ の値を決定する方法について説明する。

以下では先ず、それらの定数の値として、とある分子断片 *frag* の水-膜間輸送自由エネルギーを用いる事を説明する (S2-2-2 を見よ)。二番目に、分子断片 *frag* の輸送自由エネルギーの値を、*frag* のオクタノール-水分配係数を用いて算出する方法について説明する。三番目に、分子断片 *frag* のオクタノール-水分配係数を、フラグメント法によって算出する方法について説明する (S2-2-3 を見よ)。四番目に、本研究で使用した分子断片 *frag* のフラグメント定数の値について記述する (S2-2-4 を見よ)。最終的に、以上の算出方法を用いる上で生じる問題点について議論する (S2-2-5 を見よ)。

S2-2-2 分子断片の輸送に必要な力学的仕事

本研究では、ポリペプチド鎖の脂質膜に対する親和性をポテンシャル項 U^{mem} を用いて表現する。 $\Delta U_i^{\text{sc}}, \Delta U^{\text{pb}}, \Delta U^{\text{Nterm}}$ 、及び、 ΔU^{Cterm} は、 U^{mem} に含まれる定数であり、以下のように定義された (S1-5-4 も参照の事)。

先ず、現実のポリペプチド鎖中に含まれる一つの分子断片 *frag* を考える。次に、シミュレーションモデルにおいて、モデルポリペプチド鎖上で *frag* に対応する部分が、水中 (脂質コア中) にある場合のポテンシャルエネルギーを $U_f^{\text{w}}(U_f^{\text{m}})$ と定義する。最終的に ΔU_f を、次式で定義する。

$$\Delta U_f = U_f^{\text{m}} - U_f^{\text{w}}. \quad (78)$$

ΔU_i^{sc} は、*flag* が *i* 番目のアミノ酸残基の側鎖 ($-R_i$) である場合の ΔU_f である。同様に、 $\Delta U^{\text{pb}}, \Delta U^{\text{Nterm}}, \Delta U^{\text{Cterm}}$ は、*frag* が主鎖の単位 ($>\frac{1}{2}(\text{CH})-\text{CONH}-\frac{1}{2}(\text{CH})<$)、N 末端 ($>\frac{1}{2}(\text{CH})-\text{NH}_2$)、C 末端 ($>\frac{1}{2}(\text{CH})-\text{COOH}$) である場合の ΔU_f である。

本研究では、 ΔU_f の値として、ポリペプチド鎖中に含まれる分子断片 *frag* を、圧力一定の条件下で、完全な

水環境中から完全な膜内環境中へ、可逆的に輸送する為に必要な力学的仕事量 ΔW_f を使用する。この ΔW_f は、ポリペプチド鎖中に含まれる分子断片 *frag* を、圧力一定の条件下で、完全な水環境中から完全な膜内環境中へ、可逆的に輸送する際の系の自由エネルギー変化 ΔG_f に等しい。それ故、本研究では、 ΔU_f の値を、次式で定義した。

$$\Delta U_f = \Delta G_f. \quad (79)$$

S2-2-3 ΔG_f の値の計算法

ΔG_f の真の値を知る事は困難であるので、本研究ではその値を以下の想定に基づいて算出した。

(i) ポリペプチド鎖中に含まれる *frag* の輸送の代わりに、小分子中に含まれる *frag* の輸送を考える。(ii) 脂質コア中への輸送の代わりに、脂質コアに性質が等価な溶媒中への輸送を考える。(iii) 伝統的に広く用いられてきたという理由から、その溶媒としてオクタノールを用いる。つまり本研究では、 ΔG_f の値は、小分子中に含まれる分子断片 *frag* を、等温等圧条件下で、水中からオクタノール中へ、可逆的に輸送する際に生じる自由エネルギー変化として算出される。

オクタノール相と水相の間で分子断片 *frag* のみを輸送すると言う事は仮想的な概念である。それ故、 ΔG_f の値は、フラグメント法を用いて、*frag* を含む小分子の輸送自由エネルギーから推定する必要がある。以下では先ず、小分子の輸送自由エネルギーをオクタノール-水分配係数から算出する方法について説明する。その後、フラグメント法を用いて ΔG_f の値を算出する方法を説明する。

分子断片-R と-X から成る小分子 R-X を水中からオクタノール中へ輸送する際の自由エネルギー変化 $\Delta G_{\text{R-X}}$ は、以下のようにして知る事ができる。先ず、オクタノールと水から成る二相系を考える。この系には、少量の溶質 R-X が溶かされており、系は平衡に達していると仮定する。すると、オクタノール中及び水中に存在する R-X 分子の化学ポテンシャルは、以下のように表される。

$$\mu_{\text{R-X},\text{o}} = \mu_{\text{R-X},\text{o}}^{\circ} + k_b T \ln[\text{R-X}]_{\text{o}}, \quad (80)$$

$$\mu_{\text{R-X},\text{w}} = \mu_{\text{R-X},\text{w}}^{\circ} + k_b T \ln[\text{R-X}]_{\text{w}}. \quad (81)$$

ここで、 $[\text{R-X}]_{\text{o}}$ 及び $[\text{R-X}]_{\text{w}}$ は、それぞれ、オクタノール相中及び水相中の R-X 分子の体積モル濃度である。 $\mu_{\text{R-X},\text{o}}^{\circ}$ 及び $\mu_{\text{R-X},\text{w}}^{\circ}$ は、それぞれ、オクタノール相中及び水相中での R-X 分子の標準化学ポテンシャルである。また、 k_b はボルツマン定数、T は系の温度である。

そして、R-X 分子の輸送に伴う自由エネルギー変化は次式で表される。

$$\Delta G_{R-X} = \mu_{R-X,o}^{\circ} - \mu_{R-X,w}^{\circ} \quad (82)$$

二相系は平衡に達していると想定したので、以下の式が成り立つと考えられる。

$$\mu_{R-X,w} = \mu_{R-X,o} \quad (83)$$

また、R-X 分子のオクタノール-水分配係数は、次式で定義される。

$$P_{R-X} = \frac{[R-X]_{o,eq}}{[R-X]_{w,eq}} \quad (84)$$

ここで、 $[R-X]_{o,eq}$ 及び $[R-X]_{w,eq}$ は、それぞれ、系が平衡状態にあるときの $[R-X]_o$ 及び $[R-X]_w$ を表す。そして、式 (80), (81), (82), (83), 及び (84) の関係を整理すると、以下の関係が導かれる。

$$\Delta G_{R-X} = -k_b T \ln P_{R-X} \quad (85)$$

ΔG_{-R} の値は、 ΔG_{R-X} の値から導く事ができる。 $\log P_{X-R}$ (\log は常用対数を表す) の値は、フラグメント法 [58] によって算出できる。このフラグメント法において補正項を無視すると、 $\log P_{X-R}$ は次式で表すことができる。

$$\log P_{R-X} = f_{-R} + f_{-X} \quad (86)$$

ここで、 f_{-R} 及び f_{-X} は、それぞれ、分子断片-R 及び-X のフラグメント定数を表す。本研究では、小分子の輸送自由エネルギーは、その分子を構成している全ての分子断片の輸送エネルギーの総和であると想定した。さらに、小分子中の断片の輸送自由エネルギーは、その断片のフラグメント定数に比例すると想定した。その結果、それらの想定と式 (85) 及び (86) より、次の式が得られる。

$$\Delta G_{-R} = -2.303 k_b T f_{-R} \quad (87)$$

最終的に、式 (79) 及び (87) を組み合わせて、次式を得る。

$$\Delta U_{-R} = -2.303 k_b T f_{-R} \quad (88)$$

切断箇所を二つ、または三つ持つ分子断片 (-R-または-R<で表す) については、小分子 X_1-R-X_2 、 $X_1-R(-X_3)-X_2$ を用いて考察する事により、式 (88) と同様の関係式が導かれる。

S2-2-4 電離する分子断片のフラグメント定数

分子断片-R がイオン化する官能基を持たない場合、 f_{-R} は水中の水素イオン濃度 $[H^+]$ に依存しない定数と

なる。しかし、イオン化する官能基を持つ場合、 f_{-R} は $[H^+]$ に依存して変化する [43]。どちらの場合においても、 f_{-R} は次式で表される。

$$f_{-R} = f_{-R,n} + \tilde{f}_{-R,i} \quad (89)$$

ここで、 $f_{-R,n}$ は、-R が全くイオン化していない状況におけるフラグメント定数を表し、 $\tilde{f}_{-R,i}$ は、 $[H^+]$ に依存する部分を表す。

式 (89) において、-R がイオン化する官能基を持たない場合、 $\tilde{f}_{-R,i} = 0$ である。しかし、イオン化する官能基を持つ場合では、 $\tilde{f}_{-R,i}$ の値は $[H^+]$ によって変化する。もし、-R に酸性の官能基が含まれているならば、 $\tilde{f}_{-R,i}$ は次式で表される。

$$\tilde{f}_{-R,i} = \log \frac{[H^+] + (10^{\Delta f_{-R}}) K_a}{[H^+] + K_a} \quad (90)$$

また、もし、-R に塩基性の官能基が含まれているならば、 $\tilde{f}_{-R,i}$ は次式で表される。

$$\tilde{f}_{-R,i} = \log \frac{K_a + (10^{\Delta f_{-R}})[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad (91)$$

式 (90) 及び (91) において、 K_a は-R の酸解離定数を表す。また、 Δf_{-R} は、断片に固有の定数であり次式で定義される。

$$\Delta f_{-R} = f_{-R,i} - f_{-R,n} \quad (92)$$

ここで、 $f_{-R,i}$ は、完全にイオン化している状態における-R のフラグメント定数である。

S2-2-5 フラグメント定数の算出

断片-R の $f_{-R,n}$ 、 K_a 、 Δf_{-R} の値が分かると、式 (88), (89), (90), (91) より、温度 T 、水素イオン濃度 $[H^+]$ における、 ΔU_{-R} の値が算出できる。

この節では、 ΔU_i^{sc} 、 ΔU^{pb} 、 ΔU^{Nterm} 、そして ΔU^{Cterm} の値を算出する為の $f_{-R,n}$ 、 K_a 、及び Δf_{-R} の値の算出方法を説明する。それらの結果は、 $f_{-R,n}$ の値については表 S2-1 に、 K_a 及び Δf_{-R} については表 S2-2 に記載した。また、pH7.8、温度 298K において算出した ΔU_i^{sc} 、 ΔU^{pb} 、 ΔU^{Nterm} 、そして ΔU^{Cterm} の値は、本文中の表 2 に示した。

$f_{-R,n}$ は、イオン化していない状態における側鎖の分子断片-R の断片定数である。本研究では、Roseman の研究 [43] を参考にして $f_{-R,n}$ の値を次のように算出した。

$$f_{-R,n} = \pi_{-R} + f_{-H} \quad (93)$$

ここで、 π_{-R} は、イオン化していない状況における断片-R の π 値であり、 f_{-H} は、水素原子-H の断片定数である。

本研究では、 π_{-R} は、Arg 側鎖を除き、文献 [43] の値を使用した。また、 $f_{-H} = 0.225$ を使用した。この値は、水素分子 H-H の分配係数+0.45 の半分として算出された。プロリン残基の側鎖断片 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) の断片定数 $f_{-\text{Pro-}}$ は、 $\pi_{-\text{Pro-}} + 2f_{-H}$ として算出する事が率直なやり方である。しかしながら本研究では、 $f_{-\text{Pro-}}$ の値を式 (93) を用いて算出した。イオン化していない状況でのアルギニン側鎖のフラグメント定数 $f_{-\text{Arg},n}$ は、次の手順で算出した。まず、文献 [43] よりプロピルグアニジウムイオン (アルギニン側鎖アナログ) の分配係数として-3.48 という値を得た。次に、 $-3.48 = f_{-\text{Arg},i} + f_{-H}$ の関係より $f_{-\text{Arg},i} = -3.705$ を得た。さらに、 $\Delta f_{-\text{Arg}} = -3.00$ と想定し [59]、最終的に式 (92) に $\Delta f_{-\text{Arg}}$ と $f_{-\text{Arg},i}$ を代入する事によって $f_{-\text{Arg},n}$ を算出した。

本研究では主鎖単位の分子断片は $>\frac{1}{2}(\text{CH})-\text{CONH}-\frac{1}{2}(\text{CH})<$ と定義したけれども、その断片定数は、分子断片 $>\text{CH}-\text{CONH}-$ の断片定数として、次のように算出した。まず、文献 [43] より分子断片 $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ の断片定数として-1.95 を得た。次に、 $-1.95 - f_{-H}$ として、 $f_{>\frac{1}{2}(\text{CH})-\text{CONH}-\frac{1}{2}(\text{CH})<}$ の値を算出した。

本研究では N 末端及び C 末端の分子断片は、それぞれ、 $>\frac{1}{2}(\text{CH})-\text{NH}_2$ 及び $>\frac{1}{2}(\text{CH})-\text{COOH}$ と定義したが、その断片定数は、それぞれ、分子断片 $-\text{NH}_2$ 及び $-\text{COOH}$ の断片定数として以下の要に算出した。 $-\text{NH}_2$ の断片定数は、 $f_{-\text{Lys},n} - 4f_{-\text{CH}_2-}$ として計算した。ここで文献 [43] より得た $f_{-\text{CH}_2-} = +0.52$ を使用した。また、 $-\text{COOH}$ の断片定数は、 $f_{-\text{Asp},n} - f_{-\text{CH}_2-}$ として計算した。ここで、 $f_{-\text{CH}_2-} = f_{-\text{Glu},n} - f_{-\text{Asp},n} = +0.53$ を用いた。

Asp, Glu, His, Lys の Δf_{-R} 及び $\text{p}K_a$ は、文献 [43] で用いられた値を使用した。N 末端及び C 末端の Δf_{-R} の値は、それぞれ、 $\Delta f_{-\text{Lys}}$ 及び $\Delta f_{-\text{Asp}}$ と同じ値とした。本研究では、 $\Delta f_{-\text{Arg}} = -3.00$ を用いた [59]。Arg 側鎖、N 末端、及び、C 末端の $\text{p}K_a$ の値は、文献 ([60] の Table III) の値を使用した。

S2-2-6 注意点

上記におけるポテンシャル定数の算出方法において、注意すべき点が二つ存在する。

一方の注意点は、膜内環境に性質が等価な溶媒としてオクタノールを選んだ事である。この選択には、伝統的に広く用いられてきた事以上の積極的な理由は無い。実際、脂質膜内環境は、オクタノールとヘキサデカンとの間にあると考えられる [43, 39]。そして、このような溶媒の違いは、主に親水性基のポテンシャル定数に敏感に影響すると考えられる。Abraham 等の掲載値 [61] によれば、疎水性官能基のみからなるエタン (CH_3CH_3) では、オクタノール-

水分配係数 $\Delta \log P_{\text{oct}} = 1.81$ に対し、ヘキサデカン-水分配係数 $\Delta \log P_{16} = 1.83$ であり、ほぼ等しく、他の疎水性基でもほぼ同じである。しかし、親水性分子では違いが大きい。例えば、エタノール ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\Delta \log P_{\text{oct}} = -0.30$, $\Delta \log P_{16} = -2.19$), 酢酸 (CH_3COOH , $\Delta \log P_{\text{oct}} = -0.17$, $\Delta \log P_{16} = -3.16$), エチルアミン ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\Delta \log P_{\text{oct}} = -0.13$, $\Delta \log P_{16} = -1.62$), そしてアセトアミド (CH_3CONH_2 , $\Delta \log P_{\text{oct}} = -1.26$, $\Delta \log P_{16} = -4.68$) である。それ故、本研究では、親水性の側鎖や主鎖を実際よりも膜に分配しやすいように見積もっている可能性がある。

もう一方の注意点は、ポリペプチド鎖中の断片のフラグメント定数を、その断片を含む小分子の分配係数から算出されたフラグメント定数と等しいと想定した事である。この問題点は、次のように説明される。分子基-A, -B と水素-H からなる化合物 H-A, H-B のオクタノール-水分配係数から導かれたフラグメント定数を、それぞれ、 f_{-A} , f_{-B} とする。そして、分子基-A, -B が共有結合して作られる分子 A-B のオクタノール-水分配係数を $\log P$ とする。このとき、-A, -B の両方またはどちらか一方が疎水性基である場合、 $\log P = f_{-A} + f_{-B}$ はほぼ成り立つ。しかし、-A, -B の両方が共に親水性基である場合、 $\log P > f_{-A} + f_{-B}$ となる。このような、分子中で親水

表 S 2-1: 各側鎖フラグメントの中性状態におけるフラグメント定数

fragment	$f_{-R,n}$	fragment	$f_{-R,n}$
Ala	+0.62	Phe	+2.50
Arg	-0.71	Pro	+1.22
Asn	-1.69	Ser	-1.02
Asp	-0.49	Thr	-0.78
Cys	+0.48	Trp	+2.34
Gln	-1.08	Tyr	+1.70
Glu	+0.05	Val	+1.53
Gly	+0.23		
His	-0.37	$-\text{NH}_2$	-1.54
Ile	+2.05	$-\text{COOH}$	-1.02
Leu	+2.05		
Lys	+0.55	$>\text{CH}-\text{CONH}-$	-2.18
Met	+1.19		

表 S 2-2: 電離するフラグメントの Δf_{-R} と酸解離定数 $\text{p}K_a$

fragment	Δf_{-R}	$\text{p}K_a$
Arg	-3.00	12.00
Asp	-4.06	3.86
Glu	-4.06	4.25
His	-3.90	6.00
Lys	-3.28	10.53
$-\text{NH}_2$	-3.28	7.50
$-\text{COOH}$	-4.06	3.80

基が近接する事で、断片定数の和から予想されるよりも分子全体の親水性が減少する効果は「近接効果」と呼ばれる。Roseman は、ポリペプチド主鎖中のペプチド結合間、及び、ペプチド結合と親水性側鎖の間において、このような近接効果が起こるはずだと論じている [43]。本研究ではこの近接効果を考慮しなかったため、親水性の側鎖や主鎖を、実際よりも水中に分配しやすい方へ見積もっている可能性がある。

オクタノールを選択した事と近接効果を無視した事によって生じる誤差は、互いに打ち消し合う方向にある。本研究で行ったシミュレーションにおいて実験結果が再現された理由の一つは、もしかしたらこのような打ち消し合いの効果にあるのかもしれない。この事については、今後更に研究を進める必要がある。

S2-3 水素結合に関連したポテンシャル定数

S2-3-1 概要

本研究では、ポリペプチド主鎖間の水素結合をペプチド結合粒子間の相互作用ポテンシャルとして表現する。このポテンシャル項には、ポテンシャル定数 k^{rep} , r_0 , $\Delta U^{\text{hb,w}}$ が含まれている。これらの定数の値は、現実の主鎖間の水素結合の相互作用がシミュレーション中でうまく再現されるように定める必要がある。

以下ではまず、現実の主鎖間の水素結合を表現する為にシミュレーション中で用いるポテンシャルの表式について説明する。次に、そのポテンシャルの式中に現れる各々のポテンシャル定数が、現実の水素結合のどのような部分を表現しているかを説明する。最終的に、それらの定数を算出した方法について説明する。

現実のポリペプチド鎖が α ヘリックス構造を形成すると、残基 i の主鎖の $\text{C}_i=\text{O}_i$ と残基 $i+4$ の主鎖の $\text{H}_{i+4}-\text{N}_{i+4}$ は水素結合 $\text{C}_i=\text{O}_i \cdots \text{H}_{i+4}-\text{N}_{i+4}$ (本研究では i 番目の水素結合と呼ぶ) を形成する (図 S1-3 を見よ)。この $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基は、 $\text{O} \cdots \text{H}$ 間距離が $\sim 1.9 \text{ \AA}$ よりも大きいときには互いに引き合う。しかし、 $\text{O} \cdots \text{H}$ 間距離が $\sim 1.9 \text{ \AA}$ 未満の時には互いに強く反発し合う。本研究では、このような主鎖間の水素結合の相互作用を、ペプチド結合粒子間の相互作用ポテンシャルとして表現する。 i 番目の水素結合を表現するポテンシャルは次式で表される。

$$\bar{U}_i^{\text{hb}} = U_i^{\text{hb}}(z_i^{\text{hb}}, r_i^{\text{hb}}) + U_{i,i+3}^{\text{rep}}(r_{i,i+3}) \quad (94)$$

ここで、右辺第一項目は、粒子 i 上の hbo_i 点と粒子 $i+3$ 上の hbh_{i+4} 点の間の引力ポテンシャル (eq-ref を見よ) であり、 $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基の間の引力的な相互作用を表現している。右辺第二項目は、粒子 i と粒子 $i+3$ の間の斥

力ポテンシャル (eq-ref を見よ) であり、 $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基の間の斥力的な相互作用を表している。

r_0 及び $\Delta U^{\text{hb,w}}$ は右辺第一項目に含まれる。 r_0 は、 $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基の間の引力的な相互作用の広がりを表す。また、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ は、水中において $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基が理想的水素結合を形成したときのポテンシャルエネルギーを表す。 k^{rep} は、右辺第二項目に含まれ、 $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基が接近したときに両者の間に働く斥力の勾配を表す。

本研究では、 $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基の間の引力的な相互作用の広がり、水中と脂質膜中で同じであると想定した。即ち、 r_0 を水素結合が形成される位置によらない定数とした。そして、 r_0 , $\Delta U^{\text{hb,w}}$, k^{rep} の値を次の二段階に分けて算出した。まず、真空中での $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基の間のポテンシャルを既存の分子力場を用いて算出する。そして、 \bar{U}_i^{hb} がこのポテンシャルに一致するように、 r_0 と k^{rep} の値を決定する (S2-3-2 を見よ)。次に、決定された r_0 と k^{rep} の値を用いた上で、 N-methylacetamide の会合に伴う自由エネルギー変化の実験値 (ref) が再現されるように $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値を決定する (S2-3-3 及び S2-3-4 を見よ)。

計算に用いたペプチド結合粒子上での hbo 点及び hbh 点の座標 (\mathbf{r}_{hbo} 及び \mathbf{r}_{hbh})、並びに、粒子間に斥力が働き始める距離 r^{rep} は、S1-6-3 において既に算出してある。右辺第一項目に含まれる $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の値は、S6 で決定する。 $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の値が決定されると、 $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}$ を水中から脂質膜中へ輸送するときに生じる自由エネルギー変化が定まる。この自由エネルギー変化は S2-3-3 及び S2-3-4 の内容と関連性が大きく、また、シミュレーション上で重要な定数であるので、S2-3-5 に記述した。

S2-3-2 定数 r_0 及び k^{rep} の算出方法

r_0 及び k^{rep} の値は、シミュレーション上で水素結合を表現するポテンシャル \bar{U}_i^{hb} を真空中における $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基の間のポテンシャル $\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}$ にフィッティングする事によって定めた。

$\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}$ は、以下のように計算した。まず、真空中に $\text{C}=\text{O}$ 基と $\text{H}-\text{N}$ 基だけが存在する系を考える。それらの各原子は x 軸上に存在し、 C , O , H , N 原子の x 座標は、それぞれ、 -1.229 \AA , 0.0 \AA , x^{H} , $x^{\text{H}} + 1.01 \text{ \AA}$ であるとする (図 S2-5(A))。つまり、 $\text{C}=\text{O}$ の結合長及び $\text{H}-\text{N}$ の結合長は固定されており、 $\text{C}=\text{O}$ と $\text{H}-\text{N}$ 間の距離だけが変化できる。そして、文献の原子力場 [56] を用いて、 $\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}$ を x^{H} の関数として次式で表した。

$$\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}(x^{\text{H}}) = U^{\text{elec}}(x^{\text{H}}) + U^{\text{vdW}}(x^{\text{H}}) \quad (95)$$

$$U^{\text{elec}}(x^{\text{H}}) = \sum_{(i,j) \in A} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (96)$$

$$U^{\text{vdW}}(x^{\text{H}}) = \sum_{(i,j) \in A} \epsilon_{ij} \left\{ \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right\} \quad (97)$$

ここで、 ϵ_0 は真空の誘電率、 r_{ij} は原子 i 及び j の間の距離である。 ϵ_{ij} 及び R_{ij} は、 i 及び j の原子の組み合わせによって異なるポテンシャル定数であり、文献の原子力場 ([56] の Table 14) で定義された値を用いた。 q は原子の電荷であり、文献 ([56] の Figure 4) 中の ALA の主鎖の値を用いた。シグマ記号は、次式で表した集合 A に含まれる原子の組 (i, j) について、それぞれ一度ずつ和をとる事を表す。

$$A = \{(C, H), (C, N), (O, H), (O, N)\} \quad (98)$$

図 S2-6 には、横軸を x^{H} 、縦軸を $\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}(x^{\text{H}})$ としてポテンシャル曲線の形状を点線で示した。 $\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}(x^{\text{H}})$ の最小値は -9.41 kJ/mol となった。

\bar{U}_i^{hb} は、以下のように計算した。まず、二つのペプチド結合粒子 i と $i+3$ のみが存在する系を考える。ここで、 $r_i, r_i^{\text{hbo}}, r_{i+4}^{\text{hbh}}, r_{i+3}$ の各座標は全て x 軸上に存在し、 $x_i^{\text{hbo}} = 1.85 \text{ \AA}$, $x_i = x_i^{\text{hbo}} - 2.351 \text{ \AA}$, $x_{i+3} = x_{i+4}^{\text{hbh}} + 2.351 \text{ \AA}$ であるとする (図 S2-5(B))。つまり、粒子 i は空間中で位置も向きも固定されている。また、粒子 $i+3$ は空間中で向きは固定されているが位置は x 軸上を移動できる。すると、 \bar{U}_i^{hb} は x_{i+4}^{hbh} の関数として、式 (94) によって算出される。ただし、式中の第一項目として、次式を使用する。

$$U_i^{\text{hb}}(z_i^{\text{hb}}, r_i^{\text{hb}}) = -9.41 [\text{kJ/mol}] \cdot h(r_i^{\text{hb}}) \quad (99)$$

ここで、 $-9.41 [\text{kJ/mol}]$ は $\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}(x^{\text{H}})$ の最小値である。

筆者は、 \bar{U}_i^{hb} のポテンシャルの形状が $\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}$ のそれに良く一致するような r_0 及び k^{rep} の値を試行錯誤によって求めた。その結果として、 $r_0 = 2.5 \text{ \AA}$ 及び $k^{\text{rep}} = 100 \text{ N/m}$ の時に、ポテンシャルの形状は良く一致する事が分かった。それ故、本研究ではこれらの値を採用した。 x_i^{hbo} の座標 1.85 \AA と $\bar{U}_{\text{Atom}}^{\text{hb}}(x^{\text{H}})$ の最小値 -9.41 kJ/mol は、 r_0 及び k^{rep} を算出する為だけに使い、シミュレーションモデル中では使用しなかった。

S2-3-3 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の算出方法

ポテンシャル定数 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ は、二つのペプチド結合粒子が水中で完全な水素結合を形成するときに伴うポテンシャルエネルギーの変化量を表す。ここで言う「完全な水素結合」とは、 i 番目の水素結合について言うと、粒

子 i と粒子 $i+3$ が次の二つの関係を満たすように配置しているという事である。

$$r_i^{\text{hbo}} = r_{i+4}^{\text{hbh}} \quad (100)$$

$$|r_{i+3} - r_i| = 2r^{\text{rep}} \quad (101)$$

本研究では $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値を、水中における N-methylacetamide(N-MAA) 分子間の水素結合の形成に伴う標準自由エネルギーの変化量の測定値 [44] を元に算出した。以下では、先ず、S2-3-4 において算出方法の概念を説明する。そして、S2-3-5 において具体的な算出方法を説明する。

S2-3-4 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の算出方法の概念

単一のペプチド結合粒子の内部構造は、N-MAA の分子構造に非常に良く似ている。そこで、この類似性を利用して、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値を次のようにして算出した。先ず、ポリペプチド鎖を形成せずに空間中に分散しているペプチド結合粒子の系 (以下では粒子系と呼ぶ) を想定し、この粒子系を N-MAA 水溶液と見なす。そして、N-MAA 分子間の水素結合形成における標準自由エネルギー変化が粒子系においても再現されるように、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値を定める。

以下では先ず、N-MAA 分子間の水素結合形成における標準自由エネルギー変化について説明する。その後で、

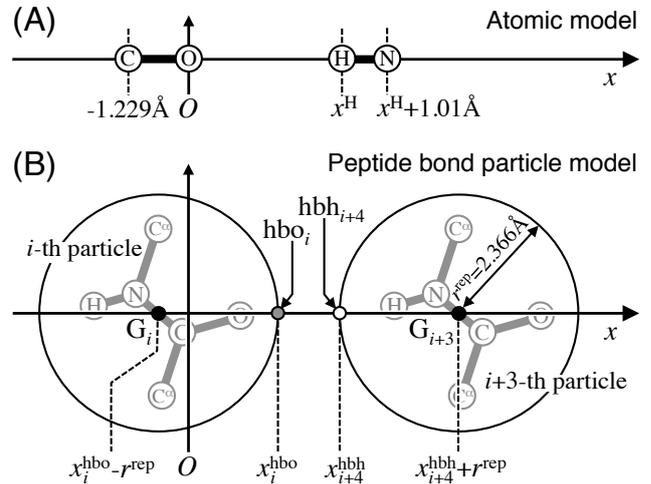
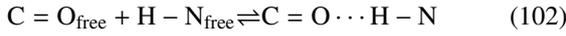


図 S2-5: (A) C=O 基と H-N 基の間の相互作用ポテンシャルを計算する為の原子の配置。O 原子は座標系の原点に固定され、C, H, N 原子は x 軸上に存在し、C=O 間及び H-N 間の共有結合長は変化しないと想定した。算出した C=O 基と N-H 基の間のポテンシャル曲線は、図 S2-6 に点線で示した。(B) ペプチド結合粒子間の水素結合相互作用を表現するポテンシャルを計算する為の粒子の配置。 i 番目及び $i+3$ 番目のペプチド結合粒子の中心、並びに、 hbo_i 点及び hbh_{i+4} 点の座標は、 x 軸上に存在する。筆者は、 $x_i^{\text{hbo}}, r_0, k^{\text{rep}}$ をフィッティングパラメータとして、粒子間の水素結合相互作用を表現するポテンシャル曲線を、C=O 基と N-H 基の間のポテンシャル曲線にフィッティングした。フィッティング後の粒子間の水素結合相互作用を表現するポテンシャル曲線は、図 S2-6 に実線で示した。

粒子系での水素結合形成における標準自由エネルギー変化について説明する。

N-MAA の分子構造 ($\text{CH}_3\text{-CONH-CH}_3$) は、ポリペプチド主鎖のペプチド結合部分の構造 ($\text{C}^\alpha\text{-CONH-C}^\alpha$) に、非常によく似ている。実際、この分子の C=O 基は別の分子の H-N 基と水素結合 $\text{C=O}\cdots\text{H-N}$ を形成できる。N-MAA 水溶液中における水素結合の形成反応は、次式で表される。



ここで、 C=O_{free} 及び H-N_{free} は、それぞれ、他の N-MAA 分子と水素結合を形成していない C=O 基及び H-N 基を表す。そして、平衡状態にある溶液においては、水素結合の形成に伴う自由エネルギー変化量は次式で算出できる。

$$\Delta F_{\text{N-MAA}}^\circ = -RT \ln \frac{[\text{C=O}\cdots\text{H-N}]}{[\text{C=O}_{\text{free}}][\text{H-N}_{\text{free}}]} \quad (103)$$

ここで、 $[\]$ は、括弧内の分子基または水素結合の体積モル濃度を表す。Klotz 等は、水溶液中で N-MAA 分子の濃度が十分希薄であるという条件の下で、 $\Delta F_{\text{N-MAA}}^\circ = 13.0\text{kJ/mol}$ という値を得た。

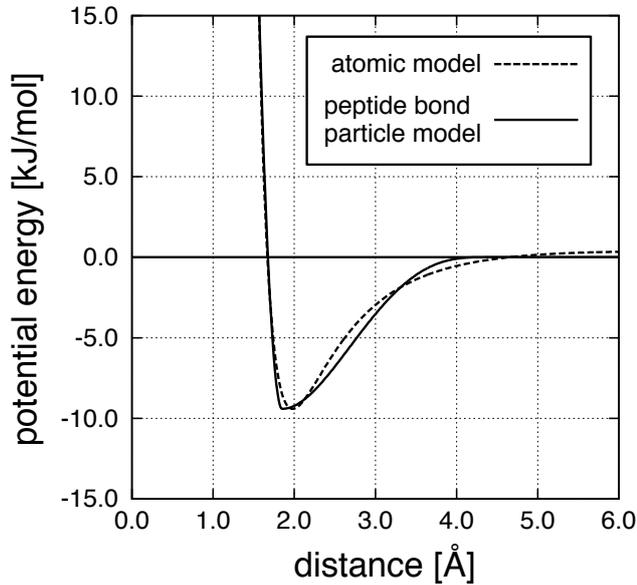


図 S2-6: 原子モデル及びペプチド結合粒子モデルのポテンシャル曲線。図中の点線は、既存の分子力場 [56] に基づいて計算した、ペプチド結合内部の C=O 基と H-N 基間の相互作用ポテンシャルを表す。相互作用ポテンシャルを計算する為の C=O 基と H-N 基の配置は、図 S2-5(A) に示した。具体的な計算手法は、S2-3-2 中に記述した。図中の点線に対して、図の横軸は、図 S2-5(A) の x^{H} を表し、また図の縦軸は C=O 基と H-N 基間の相互作用ポテンシャルエネルギーを表す。図中の実線は、二つのペプチド結合粒子間の水素結合を表現するポテンシャル曲線を、図中の点線にフィッティングした結果を表す。ポテンシャル曲線を計算する為の二つのペプチド結合粒子の配置は、図 S2-5(B) に示した。具体的な計算手法は、S2-3-1 及び S2-3-2 中に記述した。図中の実線に対して、図の横軸は、図 S2-5(B) の x_{i+4}^{hbh} を表し、また図の縦軸は二つのペプチド結合粒子間の相互作用ポテンシャルエネルギーを表す。

粒子系での水素結合形成における標準自由エネルギー変化は、次のように計算した。まず、一辺の長さ $2L$ かつ体積 V である立方体の空間中に、 N 個のペプチド結合粒子 ($0\sim N-1$) が分散しており、温度 T の巨大な熱浴に接し、熱平衡に達している系を考える。この系の全ポテンシャル U^{sys} を、次のように表す。

$$U^{\text{sys}} = U^{\text{hb}} + U^{\text{rep}} \quad (104)$$

ここで、 U^{hb} は、粒子間の水素結合の引力部分を表現するポテンシャル項の総和である。ポリペプチド鎖の場合と異なり、水素結合は、全ての hbo 点と全ての hbh 点の間（ただし同一粒子上に存在する二点間を除く）で計算する。また、 U^{rep} は、全ての粒子間の斥力ポテンシャル項の総和である。そして、平衡状態におけるこの系の水素結合形成における標準自由エネルギー変化を、式 (103) と同様に次式で表す。

$$\Delta F_{\text{pbp}}^\circ = -RT \ln \left(\frac{\rho_{\text{hb}}}{\rho_{\text{hbo}} \rho_{\text{hbh}}} \right) \quad (105)$$

ここで ρ_{hb} は、粒子間に形成された水素結合の体積モル濃度を表す。 $\rho_{\text{hbo}}^{\text{hbo}}$ 及び $\rho_{\text{hbh}}^{\text{hbh}}$ は、それぞれ、水素結合を形成していない hbo 点及び hbh 点の体積モル濃度を表す。

$\Delta F_{\text{pbp}}^\circ$ の値は、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ によって変化する。それ故、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値を、粒子の濃度が非常に希薄であるという条件の下で、次式を満たすように定める。

$$\Delta F_{\text{N-MAA}}^\circ = \Delta F_{\text{pbp}}^\circ \quad (106)$$

上式を満たす $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の算出方法は、S2-3-5 に記述した。

S2-3-5 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の具体的な計算方法

式 (106) を満たす $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値は、統計力学的手法と若干の数値計算を用いて算出できる。結論から言うと、 $\Delta F_{\text{pbp}}^\circ$ を $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の関数として表せば良い。 $\Delta F_{\text{pbp}}^\circ$ を算出する為には、平衡状態かつ十分希薄な粒子濃度であるような粒子系の ρ_{hb} の値を求めればよい。そのような ρ_{hb} の値は次の手順で求める事ができる。まず、粒子系の全状態 W のうち水素結合の数が n であるような部分状態を W_n とし、 W_n の部分分配関数を $z(W_n)$ とする。そして、 $z(W_n)$ を最大にする n を算出すると、平衡状態における ρ_{hb} が求められる。

以下では、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の算出法について、以下の手順で記述する。(i) 粒子系の状態を定義する。(ii) 粒子間の水素結合を定義する。(iii) 部分分配関数 $z(W_n)$ を算出する。(iv) $z(W_n)$ を最大にする n を求め、 $\Delta F_{\text{pbp}}^\circ$ を $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の関数として表す。(v) 式 (133) を用いて、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ を算出す

る。

粒子系の状態と分配関数

粒子 i の位置を x_i, y_i, z_i で表す。また、粒子 i の向きを、粒子に固定した座標系の外部座標系に対する $Z-Y-Z$ 系のオイラー角 $\alpha_i, \beta_i, \gamma_i$ で表す。そして、これら 6 つの数値で定められる粒子 i の座標を一つに纏めて q_i で表す。各座標に対する運動量はボルツマン分布となつていと想定し、粒子の運動量に依存する部分を位相空間に関する議論から省く。すると系の状態は、全粒子の座標 q のみに依存し、次式で表される。

$$q = \{q_0, q_1, \dots, q_{N-1}\} \quad (107)$$

状態 q にある系全体のポテンシャルエネルギーを $U^{\text{sys}}(q)$ で表す。系の全状態 W の分配関数 Z は、次式で表される。

$$Z = \int_D \exp\{-\beta U^{\text{sys}}(q)\} dq \quad (108)$$

ここで、

$$\int_D dq = \prod_i \int_D dq_i \quad (109)$$

$$\int_D dq_i = \int_{-L}^{+L} dx_i \int_{-L}^{+L} dy_i \int_{-L}^{+L} dz_i \int_0^{2\pi} d\alpha_i \int_0^\pi \sin\beta_i d\beta_i \int_0^{2\pi} d\gamma_i \quad (110)$$

である。また、

$$\int_{-L}^{+L} dx_i \int_{-L}^{+L} dy_i \int_{-L}^{+L} dz_i = V \quad (111)$$

$$\int_0^{2\pi} d\alpha_i \int_0^\pi \sin\beta_i d\beta_i \int_0^{2\pi} d\gamma_i = 8\pi^2 \quad (112)$$

である。

粒子間の水素結合の定義

粒子 i 上の hbo 点の座標 r_i^{hbo} と粒子 j 上の hbh 点の座標 r_{j+1}^{hbh} との間に次の関係を満たすとき、それら二点は水素結合を形成していると定義する。

$$|r_{j+1}^{\text{hbh}} - r_i^{\text{hbo}}| < r_{\text{lim}}^{\text{hb}} \quad (113)$$

ここで、 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ は、水素結合を形成していると判定する為の最大距離である。 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ の具体的な値は後述する。

また、粒子 i 上の hbo 点と粒子 j 上の hbh 点との間での水素結合の形成状態を判定する関数を $f(q_i, q_j)$ とし、次式で表す。

$$f(q_i, q_j) = \begin{cases} 1 & (|r_{j+1}^{\text{hbh}} - r_i^{\text{hbo}}| < r_{\text{lim}}^{\text{hb}}) \\ 0 & (r_{\text{lim}}^{\text{hb}} \leq |r_{j+1}^{\text{hbh}} - r_i^{\text{hbo}}|) \end{cases} \quad (114)$$

そして、状態 q にある系の水素結合の数 $n(q)$ を次式で表す。

$$n(q) = \sum_i \sum_{j(j \neq i)} f(q_i, q_j) \quad (115)$$

すると、状態 q にある系の水素結合の体積モル濃度 $\rho_{\text{hb}}(q)$ は次式で表される。

$$\rho_{\text{hb}}(q) = n(q)/(V\rho^\circ) \quad (116)$$

ここで、 ρ° は、基準となる体積モル濃度、 $1.0\text{mol}/(\text{dm})^3$ である。

ρ° を用いると、粒子系の全粒子の体積モル濃度は、次式で表される。

$$\rho_0 = N/(V\rho^\circ) \quad (117)$$

部分分配関数の算出

系の全粒子の濃度は非常に希薄であるならば、水素結合の濃度もまた希薄であると見なせる。この場合、粒子が三量体以上の多量体を形成する事を無視できる。即ち、粒子の結合状態として単量体と二量体のみを考えればよい。そして、hbo 点と hbh 点の両点で同時に水素結合を形成している粒子は存在しないと考える。この近似の結果、水素結合の数が n である部分状態 W_n は、水素結合している粒子の組み合わせによってさらに M_n 個の部分状態に分割できる。

水素結合の数が n である状態において、水素結合している粒子の組み合わせは次のような集合 A_n を用いて表現できる。

$$A_n = \{(k_1, l_1), (k_2, l_2), \dots, (k_n, l_n)\} \quad (118)$$

ここで、集合の要素 (k, l) は、粒子 k の hbo 点が粒子 l の hbh 点と水素結合を形成している事を表す。

互いに異なる集合 A_n の総数を M_n で表す。水素結合を形成している粒子の組み合わせが A_n で表される部分状態を $W_{n,A}$ で表す。そして、 $W_{n,A}$ の部分分配関数を $z(W_{n,A})$ とする。水素結合の数が等しいならば、粒子の組み合わせによらず $z(W_{n,A})$ は同一となる。その結果、次式が得られる。

$$z(W_n) = M_n \cdot z(W_{n,A}) \quad (119)$$

つまり、 $z(W_n)$ を算出する為には、 M_n 及び $z(W_{n,A})$ を算出すればよい。

互いに異なる集合 A_n の総数 M_n は、次の様にして求める事ができる。先ず、 N 個の粒子から、hbo 点側で水素結合している n 個の粒子を選択する場合の数は、 ${}_N C_n$

通り。次に、残った $N-n$ 個の粒子から、hbh 点側で水素結合している n 個の粒子を選択する場合の数は ${}_{N-n}C_n$ 通り。そして、hbo 点側で水素結合している粒子に、hbh 点側で水素結合している粒子を一一対一に対応させる場合の数は、 ${}_n P_n$ 通り。これらを合わせて、

$$M_n = {}_N C_n \cdot {}_{N-n} C_n \cdot {}_n P_n \quad (120)$$

となる。

部分状態 $W_{n,A}$ の部分分配関数 $z(W_{n,A})$ は、次のように表される。

$$z(W_{n,A}) = z_{\text{mono}}^{N-2n} \cdot z_{\text{di}}^n \quad (121)$$

ここで、 z_{mono} は、水素結合せず単量体で存在する一つの粒子の分配関数である。粒子の濃度が希薄である場合、式 (111) と式 (112) より、次式で表される。

$$z_{\text{mono}} = \int_D dq = 8\pi^2 V \quad (122)$$

また、 z_{di} は、 A_n の要素 (k,l) で表されるような水素結合状態にある粒子対の分配関数である。粒子の濃度が希薄である場合、次式で表される。

$$z_{\text{di}} = \int_D \int_D \exp\{-\beta U_{\text{di}}(q_k, q_l)\} f(q_k, q_l) dq_k dq_l \quad (123)$$

ここで、 $U_{\text{di}}(q_k, q_l)$ は粒子対のポテンシャルであり、式 (94) より、次式で表される。

$$U_{\text{di}}(q_k, q_l) = U_{\text{di}}^{\text{hb}}(q_k, q_l) + U_{\text{di}}^{\text{rep}}(q_k, q_l) \quad (124)$$

ここで、 $U_{\text{di}}^{\text{hb}}(q_k, q_l)$ は、粒子 k 上の hbo 点と粒子 l 上の hbh 点の水素結合ポテンシャルの引力的部分を表す。具体的には、次式で表される。

$$U_{\text{di}}^{\text{hb}}(q_k, q_l) = \Delta U^{\text{hb,w}} \cdot h(r_{\text{di}}^{\text{hb}}) \quad (125)$$

ここで、 $r_{\text{di}}^{\text{hb}} = |\mathbf{r}_k^{\text{hbo}} - \mathbf{r}_{l+1}^{\text{hbh}}|$ である。

また、 $U_{\text{di}}^{\text{rep}}$ は、二粒子間の斥力ポテンシャルであり、次式で表される。

$$U_{\text{di}}^{\text{rep}} = \begin{cases} \frac{k^{\text{rep}}}{2} (2r^{\text{rep}} - r_{k,l})^2 & (r_{k,l} < r^{\text{rep}}) \\ 0 & (r^{\text{rep}} \leq r_{k,l}) \end{cases} \quad (126)$$

ここで、 $r_{k,l} = |\mathbf{r}_l - \mathbf{r}_k|$ である。

$U_{\text{di}}(q_k, q_l)$ の値は、二粒子の相対的配置のみによって定まる。それ故、式 (123) の被積分関数、

$$\int_D \exp\{-\beta U_{\text{di}}(q_k, q_l)\} f(q_k, q_l) dq_k \quad (127)$$

の値は、 q_l に依存しない。その結果、 z_{di} は、次式のように記述できる。

$$z_{\text{di}} = \int_D u dq_l = 8\pi^2 V u \quad (128)$$

$$u = \int_D \exp\{-\beta U_{\text{di}}(q_k, \bar{q})\} f(q_k, \bar{q}) dq_k \quad (129)$$

ここで、 \bar{q} は、計算に都合の良い座標である。

$\Delta U^{\text{hb,w}}$ の算出方法

$z(W_n)$ を最大にする n の条件は、次式で表される。

$$d \ln z(W_n) / dn = 0 \quad (130)$$

式 (119) を式 (127) に代入し、さらに、スターリングの近似式、

$$\ln N! \approx N \ln N - N \quad (131)$$

を用いて式を整理すると、次式を得る。

$$\ln \frac{\rho_{\text{hb}}}{(\rho_0 - 2\rho_{\text{hb}})^2} = \ln \frac{u}{8\pi^2} + \ln \rho^{\circ} \quad (132)$$

ここで、 $n \ll N$ であるなら、 $\rho_0 - 2\rho_{\text{hb}} \cong \rho_{\text{free}}$ という近似を用いてよい。すると、上式の左辺は $\ln(\rho_{\text{hb}}/\rho_{\text{free}}^2)$ となる。これを式 (105) に代入して、最終的に次式を得る。

$$\Delta F_{\text{pbp}}^{\circ} = -RT \ln \frac{u(\Delta U^{\text{hb,w}})}{8\pi^2} - RT \ln \rho^{\circ} \quad (133)$$

上式では、 u が $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の関数である事を明示した。図 S2-7 には、様々な $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ の値における $\Delta U^{\text{hb,w}}$ と $\Delta F_{\text{pbp}}^{\circ}$ の関係をグラフに示した。 u の値は、式 (129) より、次式で表される座標 \bar{q} を用い数値計算により算出した。

$$x = y = z = \alpha = \beta = \gamma = 0 \quad (134)$$

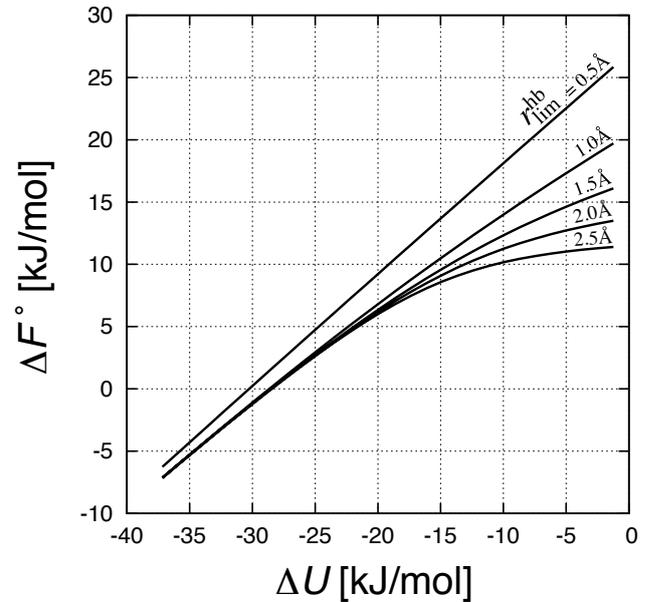


図 S2-7: ペプチド結合粒子の分散系における、完全な水素結合のポテンシャルエネルギーと、水素結合の形成に伴う自由エネルギー変化の関係。横軸は、ペプチド結合粒子間に形成される完全な水素結合のポテンシャルエネルギーの値を表す。縦軸は、ペプチド結合粒子間における水素結合の形成に伴う自由エネルギー変化量を表す。図中の実線は、様々な $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ の値における ΔU と ΔF° の間の関係を表す。

最終的に、 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ の値を選択するという問題が残る。 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ は、hbh 点と hbo 点が水素結合を形成しているかどうかを判定する基準となる値である。本研究では、以下の理由から、 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}} = 1.5\text{\AA}$ を使用した。Klotz 等の研究 [44] では、水素結合の形成状態を赤外分光スペクトルの変化によって評価している。それ故、筆者は、 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ の値を、最も安定な水素結合を形成した状態にある二つの N-MAA 分子を、赤外分光スペクトルが水素結合の存在を示さなくなる所まで引き離す為に必要な距離とする事を考えた。筆者は、その距離は水分子の直径 $\approx 3.0\text{\AA}$ 程度よりは小さいだろうと推測し、 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}} = 1.5\text{\AA}$ と決定した。 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値は、図 S2-7 より、 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}} = 1.5\text{\AA}$ において、 $\Delta F_{\text{pbp}}^{\circ}$ が、Klotz 等の測定値、 $\Delta F_{\text{N-MAA}}^{\circ} = 13.0\text{kJ/mol}$ となる値として求められる。その結果として、本研究では $\Delta U^{\text{hb,w}}$ としして次の値を採用した。

$$\Delta U^{\text{hb,w}} = -8.726\text{kJ/mol} \quad (135)$$

最後に、 $\Delta U^{\text{hb,w}}$ の値の決定方法の問題点について記述する。一方は、 $r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ の値の選択において明らかに大きな任意性がある事である。もう一方は、 α ヘリックスの形成に伴う主鎖中での水素結合の形成のモデルとして、水中における N-MAA 分子間の水素結合の形成が適切であるかどうかという問題である。これらの問題点については、今後の研究に委ねたい。

S3 粒子に働く力とトルク

S3-1 粒子に働く力とトルクの一般的な計算式

シミュレーション系が状態 \mathbf{q} にあるとする。このとき、 i 番目のペプチド結合粒子に働く力 \mathbf{F}_i は、次式で求められる。

$$\mathbf{F}_i = - \left(\mathbf{x} \frac{\partial}{\partial x_i} + \mathbf{y} \frac{\partial}{\partial y_i} + \mathbf{z} \frac{\partial}{\partial z_i} \right) U^{\text{sys}}(\mathbf{q}) \quad (136)$$

ここで、 $U^{\text{sys}}(\mathbf{q})$ は状態 \mathbf{q} にある系全体のポテンシャルを表す。 $x_i, y_i,$ 及び z_i は、それぞれ、粒子 i の位置 \mathbf{r}_i の $x, y,$ 及び z 座標を表す。 $\mathbf{x}, \mathbf{y},$ 及び \mathbf{z} は、それぞれ、シミュレーション系に固定された座標系 (外部座標系) の $x, y,$ 及び z 軸の単位ベクトルを表す。

また、粒子 i に働くトルク \mathbf{T}_i は、次式で求められる。

$$\mathbf{T}_i = - \left(\mathbf{x} \frac{\partial}{\partial \alpha_i} + \mathbf{y} \frac{\partial}{\partial \beta_i} + \mathbf{z} \frac{\partial}{\partial \gamma_i} \right) U^{\text{sys}}(\mathbf{q}) \quad (137)$$

ここで、偏微分 $\partial U^{\text{sys}}(\mathbf{q}) / \partial \alpha_i$ を、次式で定義した。

$$\frac{\partial}{\partial \alpha_i} U^{\text{sys}}(\mathbf{q}) = \lim_{\Delta \alpha_i \rightarrow 0} \frac{U^{\text{sys}}(\mathbf{q}') - U^{\text{sys}}(\mathbf{q})}{\Delta \alpha_i} \quad (138)$$

ここで、 \mathbf{q}' は、状態 \mathbf{q} にある系において、粒子 i のみを粒子の中心 \mathbf{r}_i を通り x 軸に平行な軸の周りに角度 $\Delta \alpha_i$ だけ回転させる事によって作り出される系の状態を表す。それぞれ、 $\partial U^{\text{sys}}(\mathbf{q}) / \partial \beta_i$ 及び $\partial U^{\text{sys}}(\mathbf{q}) / \partial \gamma_i$ は、 $\partial U^{\text{sys}}(\mathbf{q}) / \partial \alpha_i$ の場合と同様に定義した。ただし、 β_i 及び γ_i の場合には、 x 軸を、それぞれ、 y 軸及び z 軸に読み替える必要がある。

S3-2 力とトルクの解析的な表現

筆者は、ポテンシャルの定義式を解析的に偏微分する事で、粒子に働く力とトルクを算出する為の解析的な式を求めた。この式を用いると、ポテンシャルを数値微分する場合にと比較して、計算量を大きく削減できる。

本研究では、系全体のポテンシャル U^{sys} は、次式で表される。

$$U^{\text{sys}} = U^{\text{pep}} + U^{\text{mem}} + U^{\text{hb}} + U^{\text{cl}} + U^{\text{wall}} \quad (139)$$

式 (136) に式 (139) を代入する事によって式 (140) が得られる。また、(137) に式 (139) を代入する事によって式 (141) が得られる。

$$\mathbf{F}_i = \mathbf{F}_i^{\text{pep}} + \mathbf{F}_i^{\text{mem}} + \mathbf{F}_i^{\text{hb}} + \mathbf{F}_i^{\text{cl}} + \mathbf{F}_i^{\text{wall}} \quad (140)$$

$$\mathbf{T}_i = \mathbf{T}_i^{\text{pep}} + \mathbf{T}_i^{\text{mem}} + \mathbf{T}_i^{\text{hb}} + \mathbf{T}_i^{\text{cl}} + \mathbf{T}_i^{\text{wall}} \quad (141)$$

ここで、 $\mathbf{F}_i^{\text{name}}$ 及び $\mathbf{T}_i^{\text{name}}$ は、それぞれ、 U^{name} のみによって粒子 i に働く力及びトルクである。以下の文章では、式 (140) 及び式 (141) の右辺の各項の表式を記述する。N 末端及び C 末端に対応する粒子、即ち、 $i = 0$ 及び $i = N$ の場合には、一般的な表式と異なる場合があり、それぞれ注記した。

粒子 i に固定された座標系 (内部座標系) の原点の座標 \mathbf{r}_i^{G} を、必要に応じて \mathbf{r}_i^{G} と表す。また、以下の略号を用いた。

$$\mathbf{r}_i^{A,B} = \mathbf{r}_i^B - \mathbf{r}_i^A \quad (142)$$

$$\mathbf{r}_{i,j}^{A,B} = \mathbf{r}_j^B - \mathbf{r}_i^A \quad (143)$$

$$\mathbf{n}_i^{A,B} = (\mathbf{r}_i^{A,B}) / |\mathbf{r}_i^{A,B}| = (\mathbf{r}_i^B - \mathbf{r}_i^A) / |\mathbf{r}_i^B - \mathbf{r}_i^A| \quad (144)$$

$$\mathbf{n}_{i,j}^{A,B} = (\mathbf{r}_{i,j}^{A,B}) / |\mathbf{r}_{i,j}^{A,B}| = (\mathbf{r}_j^B - \mathbf{r}_i^A) / |\mathbf{r}_j^B - \mathbf{r}_i^A| \quad (145)$$

$$g'(z) = dg(z)/dz \quad (146)$$

$$h'(r) = dh(r)/dr \quad (147)$$

S3-3 U^{pep} による力とトルク

S3-3-1 ポリペプチド鎖を構成するポテンシャルについて

ポテンシャル項 U^{pep} は、次式で表される。

$$U^{\text{pep}} = U^{\text{b}} + U^{\text{a}} + U^{\text{da}} + U^{\text{rep}} \quad (148)$$

それ故、 $\mathbf{F}_i^{\text{pep}}$ 及び $\mathbf{T}_i^{\text{pep}}$ は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{pep}} = \mathbf{F}_i^{\text{b}} + \mathbf{F}_i^{\text{a}} + \mathbf{F}_i^{\text{da}} + \mathbf{F}_i^{\text{rep}} \quad (149)$$

$$\mathbf{T}_i^{\text{pep}} = \mathbf{T}_i^{\text{b}} + \mathbf{T}_i^{\text{a}} + \mathbf{T}_i^{\text{da}} + \mathbf{T}_i^{\text{rep}} \quad (150)$$

以下では、式 (149) 及び式 (150) の右辺の各項の表式について記述する。

S3-3-2 U^{b} による力とトルク

ポテンシャル項 U^{b} によって、粒子 i に働く力 \mathbf{F}_i^{b} とトルク \mathbf{T}_i^{b} は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{b}} = k^{\text{b}}(\mathbf{r}_i^{\text{ac,an}} + \mathbf{r}_{i+1}^{\text{an,ac}}) \quad (151)$$

$$\mathbf{T}_i^{\text{b}} = k^{\text{b}} \left\{ (\mathbf{r}_i^{\text{ac}} - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{r}_i^{\text{ac,an}} + (\mathbf{r}_{i+1}^{\text{an}} - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{r}_{i+1}^{\text{an,ac}} \right\} \quad (152)$$

ここで、 $\mathbf{r}_0^{\text{ac,an}} = \mathbf{0}$ 、また、 $\mathbf{r}_{N+1}^{\text{an,ac}} = \mathbf{0}$ と定義する。

S3-3-3 U^{a} による力とトルク

ポテンシャル項 U^{a} によって、粒子 i に働く力は、 $\mathbf{F}_i^{\text{a}} = \mathbf{0}$ である。トルク \mathbf{T}_i^{a} は、次式で表される。

$$\mathbf{T}_i^{\text{a}} = k^{\text{a}} \left\{ (\theta_i - \theta_{\text{eq}}) \mathbf{n}_1 + (\theta_{i+1} - \theta_{\text{eq}}) \mathbf{n}_2 \right\} \quad (153)$$

ここで、 \mathbf{n}_1 及び \mathbf{n}_2 は、次式で表される。

$$\mathbf{n}_1 = (\mathbf{r}_i^{\text{ac,C}} \times \mathbf{r}_i^{\text{an,N}}) / |\mathbf{r}_i^{\text{ac,C}} \times \mathbf{r}_i^{\text{an,N}}| \quad (154)$$

$$\mathbf{n}_2 = (\mathbf{r}_{i+1}^{\text{an,N}} \times \mathbf{r}_{i+1}^{\text{ac,C}}) / |\mathbf{r}_{i+1}^{\text{an,N}} \times \mathbf{r}_{i+1}^{\text{ac,C}}| \quad (155)$$

ただし、 $i = 0$ のとき $\mathbf{n}_1 = \mathbf{0}$ 、そして、 $i = N$ のとき $\mathbf{n}_2 = \mathbf{0}$ と定義する。

S3-3-4 U^{da} による力とトルク

ポテンシャル項 U^{da} によって、粒子 i に働く力 \mathbf{F}_i^{da} とトルク \mathbf{T}_i^{da} については、最初に一般的な二面角ポテンシャルの表式の場合について記述する。その後、本研究に用いた二面角ポテンシャルの表式の場合での近似式について記述する。

まず、二面角ポテンシャルが $U_i^{\text{da}}(\phi_i, \psi_i)$ と表記される場合について記述する。このとき、粒子 i に働く力は $\mathbf{F}_i^{\text{da}} = \mathbf{0}$ となる。トルク \mathbf{T}_i^{da} は、次式で表される。

$$\mathbf{T}_i^{\text{da}} = \mathbf{T}_{i\phi 1}^{\text{da}} + \mathbf{T}_{i\phi 2}^{\text{da}} + \mathbf{T}_{i\psi 1}^{\text{da}} + \mathbf{T}_{i\psi 2}^{\text{da}} \quad (156)$$

ここで、

$$\mathbf{T}_{i\phi 1}^{\text{da}} = -\frac{\partial U_i^{\text{da}}(\phi_i, \psi_i)}{\partial \phi_i} \mathbf{f}(\mathbf{n}_i^{\text{N,an}}, \mathbf{n}_i^{\text{ac,C}}) \quad (157)$$

$$\mathbf{T}_{i\phi 2}^{\text{da}} = \frac{\partial U_{i+1}^{\text{da}}(\phi_{i+1}, \psi_{i+1})}{\partial \phi_{i+1}} \mathbf{f}(\mathbf{n}_{i+1}^{\text{N,an}}, \mathbf{n}_{i+1}^{\text{ac,C}}) \quad (158)$$

$$\mathbf{T}_{i\psi 1}^{\text{da}} = \frac{\partial U_i^{\text{da}}(\phi_i, \psi_i)}{\partial \psi_i} \mathbf{f}(\mathbf{n}_i^{\text{C,ac}}, \mathbf{n}_i^{\text{an,N}}) \quad (159)$$

$$\mathbf{T}_{i\psi 2}^{\text{da}} = -\frac{\partial U_{i+1}^{\text{da}}(\phi_{i+1}, \psi_{i+1})}{\partial \psi_{i+1}} \mathbf{f}(\mathbf{n}_{i+1}^{\text{C,ac}}, \mathbf{n}_{i+1}^{\text{an,N}}) \quad (160)$$

である。 \mathbf{f} はベクトル関数であり、次式で表される。

$$\mathbf{f}(\mathbf{n}_1, \mathbf{n}_2) = \mathbf{n}_1 - \frac{\mathbf{n}_1 \cdot \mathbf{n}_2}{\sqrt{1 - (\mathbf{n}_1 \cdot \mathbf{n}_2)^2}} \frac{\mathbf{n}_2 - (\mathbf{n}_1 \cdot \mathbf{n}_2) \mathbf{n}_1}{|\mathbf{n}_2 - (\mathbf{n}_1 \cdot \mathbf{n}_2) \mathbf{n}_1|} \quad (161)$$

ここで、結合角 $\angle \text{N}_i \text{C}_i^\alpha \text{C}_i$ と平衡結合角 θ_{eq} との差が、常に十分小さく保たれる場合、次の近似式を用いてシミュレーションを行っても、計算結果は殆ど変化しない。

$$\mathbf{f}(\mathbf{n}_1, \mathbf{n}_2) \cong \mathbf{n}_1 \quad (162)$$

実際、本研究では、 $\angle \text{N}_i \text{C}_i^\alpha \text{C}_i$ がほぼ常に θ_{eq} 付近となるような拘束ポテンシャルを使用した。それ故、筆者は、本研究で用いた具体的な二面角ポテンシャル項 U^{da} に、式 (161) の代わりに、式 (162) を用いて、次式を導いた。

$$\mathbf{T}_i^{\text{da}} = -\text{Pro}(i) k_\phi^{\text{Pro}} (\phi_i - \phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}) \mathbf{n}_i^{\text{N,an}} + \text{Pro}(i+1) k_\phi^{\text{Pro}} (\phi_{i+1} - \phi_{\text{eq}}^{\text{Pro}}) \mathbf{n}_{i+1}^{\text{N,an}} \quad (163)$$

ここで、 $\text{Pro}(i)$ は、 i 番目のアミノ酸が Pro のとき 1、それ以外するとき 0 をとる関数である。

S3-3-5 U^{rep} による力とトルク

ポテンシャル項 U^{rep} によって、粒子 i に働く力 $\mathbf{F}_i^{\text{rep}}$ は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{rep}} = \sum_{j=0}^{i-3} \mathbf{F}_{i,j}^{\text{rep}} + \sum_{j=i+3}^N \mathbf{F}_{i,j}^{\text{rep}} \quad (164)$$

ここで、

$$\mathbf{F}_{i,j}^{\text{rep}} = \begin{cases} \mathbf{0} & (2r^{\text{rep}} \leq |\mathbf{r}_{i,j}|) \\ -k^{\text{rep}}(2r^{\text{rep}} - |\mathbf{r}_{i,j}|) \mathbf{n}_{i,j} & (|\mathbf{r}_{i,j}| < 2r^{\text{rep}}) \end{cases} \quad (165)$$

である。ただし、 i または j が、 $0 \leq i$ または $j \leq N$ を満たさない場合、 $\mathbf{F}_{i,j}^{\text{rep}} = \mathbf{0}$ とする。粒子 i に働くトルクは、 $\mathbf{T}_i^{\text{rep}} = \mathbf{0}$ となる。

S3-4 U^{mem} による力とトルク

アミノ酸の脂質膜に対する親和性を表現するポテンシャル項 U^{mem} は、次式で表される。

$$U^{\text{mem}} = U^{\text{mc}} + U^{\text{sc}} \quad (166)$$

それ故、粒子 i に働く力とトルク $\mathbf{F}_i^{\text{mem}}$ 及び $\mathbf{T}_i^{\text{mem}}$ は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{mem}} = \mathbf{F}_i^{\text{mc}} + \mathbf{F}_i^{\text{sc}} \quad (167)$$

$$\mathbf{T}_i^{\text{mem}} = \mathbf{T}_i^{\text{mc}} + \mathbf{T}_i^{\text{sc}} \quad (168)$$

ポテンシャル U^{mc} によって粒子 i に働く力 \mathbf{F}_i^{mc} は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{mc}} = -\Delta U_i^{\text{mc}} g'(z_i) \mathbf{z} \quad (169)$$

ここで、 \mathbf{z} は、外部座標系の z 軸の単位ベクトルを表す。 z_i は、粒子 i の z 座標を表す。粒子に働くトルクは、 $\mathbf{T}_i^{\text{mc}} = \mathbf{0}$ である。

ポテンシャル項 U^{sc} によって粒子 i に働く力とトルクは、以下の手順で計算される。粒子 i には、 i 番目と $i+1$ 番目のアミノ酸側鎖のポテンシャルが関与する。まず i 番目のアミノ酸側鎖について、

$$\mathbf{F}_{i1}^{\text{sc}} = -\frac{1}{2} \Delta U_i^{\text{sc}} g'(z_i^\alpha) \mathbf{z} \quad (170)$$

$i+1$ 番目のアミノ酸側鎖について、

$$\mathbf{F}_{i2}^{\text{sc}} = -\frac{1}{2} \Delta U_{i+1}^{\text{sc}} g'(z_{i+1}^\alpha) \mathbf{z} \quad (171)$$

となる。ここで、 $z_i^\alpha, z_{i+1}^\alpha$ は、 $\mathbf{r}_i^\alpha, \mathbf{r}_{i+1}^\alpha$ の z 座標を表す。また、 $i=0$ なら $\mathbf{F}_{i1}^{\text{sc}} = \mathbf{0}$ 、 $i=N$ なら $\mathbf{F}_{i2}^{\text{sc}} = \mathbf{0}$ と定義する。これらを合わせて、粒子 i に働く力 \mathbf{F}_i^{sc} は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{sc}} = \mathbf{F}_{i1}^{\text{sc}} + \mathbf{F}_{i2}^{\text{sc}} \quad (172)$$

また、粒子 i に働くトルク \mathbf{T}_i^{sc} は、次式で表される。

$$\mathbf{T}_i^{\text{sc}} = (\mathbf{r}_i^{\alpha c} - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{F}_{i1}^{\text{sc}} + (\mathbf{r}_{i+1}^{\alpha n} - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{F}_{i2}^{\text{sc}} \quad (173)$$

S3-5 U^{hb} による力とトルク

主鎖間の水素結合のポテンシャル U^{hb} によって粒子 i に働く力 \mathbf{F}_i^{hb} とトルク \mathbf{T}_i^{hb} は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{hb}} = \mathbf{F}_{i1}^{\text{hb}} + \mathbf{F}_{i2}^{\text{hb}} \quad (174)$$

$$\mathbf{T}_i^{\text{hb}} = (\mathbf{r}_{i+1}^{\text{hbh}} - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{F}_{i1}^{\text{hb}} + (\mathbf{r}_i^{\text{hbo}} - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{F}_{i2}^{\text{hb}} \quad (175)$$

ここで、 $\mathbf{F}_{i1}^{\text{hb}}$ は、粒子 i に含まれる水素側結合点 hbh_{i+1} に働く力であり、式(176)で表される。また、 $\mathbf{F}_{i2}^{\text{hb}}$ は、粒子 i に含まれる酸素側結合点 hbo_i に働く力であり、式(177)で表される。

$$\mathbf{F}_{i1}^{\text{hb}} = -\frac{1}{2} Z(z_{i-3}^{\text{hb}}, r_{i-3}^{\text{hb}}) \mathbf{z} - R(z_{i-3}^{\text{hb}}, r_{i-3}^{\text{hb}}) \mathbf{n}_{i-3}^{\text{hb}} \quad (176)$$

$$\mathbf{F}_{i2}^{\text{hb}} = -\frac{1}{2} Z(z_i^{\text{hb}}, r_i^{\text{hb}}) \mathbf{z} + R(z_i^{\text{hb}}, r_i^{\text{hb}}) \mathbf{n}_i^{\text{hb}} \quad (177)$$

ここで、二つの関数 $Z(z, r)$ 及び $R(z, r)$ は、次式で表される。

$$Z(z, r) = (\Delta U^{\text{hb,m}} - \Delta U^{\text{hb,w}}) h(r) g'(z) \quad (178)$$

$$R(z, r) = \left\{ (\Delta U^{\text{hb,m}} - \Delta U^{\text{hb,w}}) g(z) + \Delta U^{\text{hb,w}} \right\} h'(r) \quad (179)$$

また、 $\mathbf{n}_{i-3}^{\text{hb}}, \mathbf{n}_i^{\text{hb}}$ は、それぞれ次式によって計算される。

$$\mathbf{n}_{i-3}^{\text{hb}} = (\mathbf{r}_{i+1}^{\text{hbh}} - \mathbf{r}_{i-3}^{\text{hbo}}) / |\mathbf{r}_{i+1}^{\text{hbh}} - \mathbf{r}_{i-3}^{\text{hbo}}| \quad (180)$$

$$\mathbf{n}_i^{\text{hb}} = (\mathbf{r}_{i+4}^{\text{hbh}} - \mathbf{r}_i^{\text{hbo}}) / |\mathbf{r}_{i+4}^{\text{hbh}} - \mathbf{r}_i^{\text{hbo}}| \quad (181)$$

S3-6 U^{cl} による力とトルク

カンチレバーの歪みのポテンシャル項 U^{cl} は、カンチレバーの針先に付着していると想定したペプチド結合粒子にのみ影響を及ぼす。そのようなペプチド粒子の番号を c 番とする。その粒子に働く力 \mathbf{F}_c^{cl} は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_c^{\text{cl}} = -k_x^{\text{cl}} x_{\text{bh}}^{\text{cl}} \mathbf{x} - k_y^{\text{cl}} y_{\text{bh}}^{\text{cl}} \mathbf{y} - k_z^{\text{cl}} z_{\text{bh}}^{\text{cl}} \mathbf{z} \quad (182)$$

ここで、 $x_{\text{bh}}^{\text{cl}}, y_{\text{bh}}^{\text{cl}}, z_{\text{bh}}^{\text{cl}}$ は、それぞれ、ベクトル $\mathbf{r}_{\text{bh}}^{\text{cl}} = \mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}} - \mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ の x, y, z 成分である。 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ は、カンチレバーの根元の座標、 $\mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}}$ は、カンチレバーの先端の座標を表す。 $\mathbf{r}_{\text{head}}^{\text{cl}}$ の値は、 \mathbf{r}_c に固定されている。 c 番の粒子に、 U^{cl} によって働くトルクは、 $\mathbf{T}_c^{\text{cl}} = \mathbf{0}$ となる。

S3-7 U^{wall} による力とトルク

特定の領域に粒子の侵入を制限するポテンシャル U^{wall} によって、粒子 i に働く力 $\mathbf{F}_i^{\text{wall}}$ は、次式で表される。

$$\mathbf{F}_i^{\text{wall}} = \begin{cases} \mathbf{0} & (r^{\text{rep}} \leq |\mathbf{r}_i^{\text{G,d}}|) \\ -k^{\text{wall}} (r^{\text{rep}} - |\mathbf{r}_i^{\text{G,d}}|) \mathbf{n}_i^{\text{G,d}} & (|\mathbf{r}_i^{\text{G,d}}| < r^{\text{rep}}) \end{cases} \quad (183)$$

ここで、 $\mathbf{r}_i^{\text{G,d}} = \mathbf{r}_i^{\text{d}} - \mathbf{r}_i$ である。 \mathbf{r}_i^{d} は、粒子の侵入が制限される特定の領域 D の中で最も \mathbf{r}_i に近い座標である。 $\mathbf{n}_i^{\text{G,d}}$ は、 $\mathbf{r}_i^{\text{G,d}}$ の単位ベクトルである。 U^{wall} によって粒子 i に働くトルクは、 $\mathbf{T}_i^{\text{wall}} = \mathbf{0}$ となる。

S4 時間発展の手法

S4-1 ブラウン動力学法

本研究のシミュレーションでは、アミノ酸の膜に対する親和性並びに主鎖間の水素結合を表現する為に、陰溶媒モデルを用いた。即ち、水分子と脂質分子を非明示的に扱った。それ故、シミュレーション系の時間発展にはブラウン運動力学法 [45, 62] を使用した。ブラウン動力学法では、溶媒分子の衝突による影響を、粒子に働く時間的にランダムな熱運動力、並びに、粒子が粘性流体中で受ける摩擦力として扱う。

本研究ではペプチド結合粒子の形状を球とし、多体粒子間の流体力学的相互作用の影響を無視した。以下では、そのような場合における、ブラウン動力学法に基づいた時間発展の式を説明する。

S4-2 粒子の並進運動

粒子 i の並進運動に関する時間発展は、次式で表される。

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \frac{D^T \Delta t}{k_b T} \mathbf{F}_i(t) + \Delta \mathbf{r}_i^B(t) \quad (184)$$

ここで、 $D^T = k_b T / (6\pi a \eta)$ は、球状粒子の並進運動における拡散定数であり、 k_b はボルツマン定数、 T は温度、 a は粒子のストークス半径、 η は溶媒の粘性率である。 $\mathbf{r}_i(t)$ 及び $\mathbf{r}_i(t + \Delta t)$ は、それぞれ、時刻 t 及び $t + \Delta t$ における粒子 i の位置を表す。 $\mathbf{F}_i(t)$ は時刻 t において粒子 i に働く力を表す。 $\Delta \mathbf{r}_i^B(t)$ は時刻 t から $t + \Delta t$ の間での粒子 i のブラウン運動による移動量であり、次式で表される。

$$\Delta \mathbf{r}_i^B(t) = (\Delta x_i^B(t), \Delta y_i^B(t), \Delta z_i^B(t))^T \quad (185)$$

ここで、 $\Delta x_i^B(t)$, $\Delta y_i^B(t)$, $\Delta z_i^B(t)$ は、それぞれ、時刻 t から $t + \Delta t$ の間での粒子 i の x, y, z 軸方向のブラウン運動による移動量を表す。これらは、次の関係式を満たす。

$$\langle (\Delta x_i^B(t))^2 \rangle = \langle (\Delta y_i^B(t))^2 \rangle = \langle (\Delta z_i^B(t))^2 \rangle = 2D^T \Delta t \quad (186)$$

このような $\Delta x_i^B(t)$, $\Delta y_i^B(t)$, $\Delta z_i^B(t)$ は、互いに相関の無い、平均 0、分散 1 の正規分布乱数 $\Delta \tilde{x}_i^B(t)$, $\Delta \tilde{y}_i^B(t)$, $\Delta \tilde{z}_i^B(t)$ を用いて、次式により作成できる。

$$\Delta x_i^B(t) = \sqrt{2D^T \Delta t} \cdot \Delta \tilde{x}_i^B(t) \quad (187)$$

$\Delta y_i^B(t)$ 及び $\Delta z_i^B(t)$ についても式 (187) と同様である。

S4-3 粒子の回転運動

粒子 i の回転運動の時間発展は以下の手順で計算される。時刻 t から $t + \Delta t$ の間での、シミュレーション座標系の x, y, z 軸周りの粒子 i の回転角度 $\Delta \alpha_i(t)$, $\Delta \beta_i(t)$, $\Delta \gamma_i(t)$ は、次式で表される。

$$\begin{pmatrix} \Delta \alpha_i(t) \\ \Delta \beta_i(t) \\ \Delta \gamma_i(t) \end{pmatrix} = \frac{D^R \Delta t}{k_b T} \mathbf{T}_i(t) + \begin{pmatrix} \Delta \alpha_i^B(t) \\ \Delta \beta_i^B(t) \\ \Delta \gamma_i^B(t) \end{pmatrix} \quad (188)$$

ここで、 $D^R = k_b T / (8\pi a^3 \eta)$ は、球状粒子の回転運動における拡散定数である。 $\Delta \alpha_i^B(t)$, $\Delta \beta_i^B(t)$, $\Delta \gamma_i^B(t)$ は、それぞれ、時刻 t から $t + \Delta t$ の間での粒子 i のブラウン運動による x, y, z 軸周りの回転角度を表す。これらは、以下の関係式を満たす。

$$\langle (\Delta \alpha_i^B(t))^2 \rangle = \langle (\Delta \beta_i^B(t))^2 \rangle = \langle (\Delta \gamma_i^B(t))^2 \rangle = 2D^R \Delta t \quad (189)$$

ここで、 $\Delta \alpha_i^B(t)$, $\Delta \beta_i^B(t)$, $\Delta \gamma_i^B(t)$ の間には、互いに相関は無い。また、 $\Delta x_i^B(t)$, $\Delta y_i^B(t)$, $\Delta z_i^B(t)$ 及び、 $\Delta \alpha_i^B(t)$, $\Delta \beta_i^B(t)$, $\Delta \gamma_i^B(t)$ の間にも、互いに相関は無い。このような乱数 $\Delta \alpha_i^B(t)$, $\Delta \beta_i^B(t)$, $\Delta \gamma_i^B(t)$ は、互いに相関の無い、平均 0、分散 1 の正規分布乱数 $\Delta \tilde{\alpha}_i^B(t)$, $\Delta \tilde{\beta}_i^B(t)$, $\Delta \tilde{\gamma}_i^B(t)$ を用いて次式により作成できる。

$$\Delta \alpha_i^B(t) = \sqrt{2D^R \Delta t} \cdot \Delta \tilde{\alpha}_i^B(t) \quad (190)$$

$\Delta \beta_i^B(t)$, $\Delta \gamma_i^B(t)$ についても式 (190) と同様である。

$\Delta \alpha_i$, $\Delta \beta_i$, $\Delta \gamma_i$ のそれぞれが微小な量である場合、 x, y, z 軸周りの回転は一つの回転に合成できる。合成された回転は、軸 $\mathbf{n} = \mathbf{v}/|\mathbf{v}|$ の周りに、角度 $\theta = |\mathbf{v}|$ の回転を行うことに等しい。ここで、

$$\mathbf{v} = (\Delta \alpha_i, \Delta \beta_i, \Delta \gamma_i)^T \quad (191)$$

である。

この合成された回転操作により、時刻 t における粒子 i の向き $\mathbf{A}_i(t)$ から時刻 $t + \Delta t$ における粒子 i の向き $\mathbf{A}_i(t + \Delta t)$ が、次式により算出される。

$$\mathbf{A}_i(t + \Delta t) = \mathbf{M} \mathbf{A}_i(t) \quad (192)$$

ここで、行列 \mathbf{M} は、 $\mathbf{n} = (n_x, n_y, n_z)^T$ という表現を用いて、以下のように計算される。

$$\mathbf{M} = (1 - \cos\theta) \mathbf{n} \mathbf{n}^T + (\cos\theta) \mathbf{E} + (\sin\theta) \mathbf{S} \quad (193)$$

ここで、

$$\mathbf{n} \mathbf{n}^T = \begin{pmatrix} n_x^2 & n_x n_y & n_x n_z \\ n_x n_y & n_y^2 & n_y n_z \\ n_x n_z & n_y n_z & n_z^2 \end{pmatrix} \quad (194)$$

$$E = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (195)$$

$$S = \begin{pmatrix} 0 & -n_z & n_y \\ n_z & 0 & -n_x \\ -n_y & n_x & 0 \end{pmatrix} \quad (196)$$

である。

S5 時間刻み幅の決定

S5-1 時間刻み幅の概算

S5-1-1 時間刻み幅の妥当性

本研究では、シミュレーション系の時間発展の手法として、ブラウン動力学法を採用した。なぜなら、非常に低速度での膜タンパク質の引き抜きシミュレーションを、ブラウン動力学法は可能にするからである。

長時間のシミュレーションを実現する為には、時間刻み幅 Δt は大きいほど良い。しかし、シミュレーション系の軌跡を正確に追跡する為には、 Δt の間に粒子が移動する範囲の間で、粒子に働く力及びトルクが概ね一定と見なせるという条件が必要となる。十分小さな Δt を用いれば、必然的に一ステップでの系の変化量は小さくなり、その条件は満たされるだろう。

本文章では、そのような Δt の上限 τ_{upper} を概算した (S5-1-2, S5-1-3)。さらに補助的なシミュレーションを実行して、強制アンフォールディングシミュレーションに、用いる Δt の値を 10fs に決定した (S5-2)。

S5-1-2 τ_{upper} の概算の手順

本研究では、次の条件 A を満たす Δt の上限として、 τ_{upper} を概算した。

条件 A

Δt の間に粒子が移動する範囲において粒子に働く力及びトルクは大きく変化しない。

そして、ペプチド結合粒子モデルによって構成されたポリペプチド鎖が溶媒中で運動している状況を想定し、条件 A を満たす Δt の範囲について考えた。実際のところ、系の全ての状態における全ての粒子の運動について調べる事は困難である。そこで例として、全原子モデルによる膜タンパク質の分子動力学シミュレーションの場

合を考えてみる。この場合、系の軌跡の正確な計算の為に必要な Δt を概算する為には、膜タンパク質の構造に関係なく、とある重原子とそれに結合した水素原子間の共有結合長の伸縮運動の周期のみを考察すれば十分だろう。この例を参考にして、筆者は以下に記述するような四つの単純化をおこなう事、つまり、調査する粒子、粒子の運動、系の状態、系のポテンシャル項を単純化する事によって、条件 A を満たす Δt の範囲を概算しようと考えた。

一つ目の単純化は、ポリペプチド鎖中の一つの粒子の運動のみを許し、他の全ての粒子の配置は、常に固定されていると想定する事である。

二つ目の単純化は、注目した粒子の運動として、一方方向への並進移動、または、粒子の中心を通る一つの軸周りの回転移動という、単純な二つの場合のみを想定する事である。

ここでは、先ず、粒子に並進移動のみを許可した場合について記述し、回転移動については後で記述する。今、注目した粒子の基準となる座標を \mathbf{r}_0 とし、 \mathbf{n}^T を移動方向の単位ベクトルとし、この移動方向に沿った座標 ξ を考えると、粒子の座標は、 $\mathbf{r} = \mathbf{r}_0 + \mathbf{n}^T \xi$ と表される。この場合、系全体のポテンシャル U^T は、 ξ のみの関数 $U^T = U(\xi)$ となる。粒子に対して \mathbf{n}^T 方向に働く力は、 $\mathbf{F} = -dU^T/d\xi$ と表される。

三つ目の単純化は、考慮する系の状態を、熱平衡状態に置いて頻繁に観察されるような状態のみに限定する事である。つまり、条件 A は、全ての ξ でなく、 $U^T(\xi) \leq k_b T$ であるような ξ について満たされていれば良いとした。

四つ目の単純化は、 U^T として、隣り合うペプチド粒子を結合するポテンシャル項のみを考慮するという事である。なぜなら、そのポテンシャル項は、粒子の移動に伴って最も激しく変化するからである。

筆者は、注目した粒子を i 番目の粒子とし、また、 $i-1$ 番目と i 番目の粒子は、 $\xi = 0$ において $\mathbf{r}_i^{an} = \mathbf{r}_i^{ac}$ となるように配置されていると想定した (図 S5-1(A))。そして、両粒子を結合するポテンシャル項 U_i^b のみを U^T として考慮し、 $U^T = (k^b/2)\xi^2$ とした。

上記の四つの単純化の他に、さらに具体的に、次の事を定めた。先ず、粒子が、時刻 t において座標 $\xi(t)$ にある状態を考える。この状態から、ブラウン動力学法によって算出される Δt 時間経過した後の粒子の位置を、 $\xi(t + \Delta t) = \xi(t) + \Delta\xi$ と記述する。また、粒子が $\xi(t)$ から $\xi(t + \Delta t)$ まで移動する間において、粒子に働く力の最大値 F_{max} 、及び最小値 F_{min} の差 $F_{\text{diff}} = |F_{\text{max}} - F_{\text{min}}|$ を定義する。そして、「十分に小さいと見なせる」という力の基準 (後述) を F_c とする。

以上の想定によって、条件 A は、近似的に、次の条件

Bに言い換えられる。

条件 B

$U^T(\xi) \leq k_b T$ を満たす任意の ξ に対し、 $F_{\text{diff}} \leq F_c$ が満たされる。

条件 B を満たす Δt の範囲を求める為に、更に詳しい状況を設定し、また、計算した。 $U^T(\xi) \leq k_b T$ を満たす ξ の範囲は、 $\xi_{\text{low}} = -\sqrt{(2k_b T)/k^b}$ 及び $\xi_{\text{up}} = \sqrt{(2k_b T)/k^b}$ を用いて、閉区間 $[\xi_{\text{low}}, \xi_{\text{up}}]$ となる。また、筆者は、「十分に小さいと見なせる」という力の基準 F_c を、 $U^T(\xi) = k_b T$ となる位置 ξ にある粒子に働く力の絶対値と定義し、 $F_c = \sqrt{2k_b T k^b}$ とした。さらに、 $F = -k^b \xi$ 、 $dF/d\xi = -k^b$ である事から、任意の ξ について $F_{\text{diff}} = k^b \Delta \xi$ となる。これらの状況設定により、条件 B は、より具体的に、以下の条件 C に言い換えられる。

条件 C

区間 $[\xi_{\text{low}}, \xi_{\text{up}}]$ に含まれる任意の ξ に対し、 $k^b \Delta \xi \leq \sqrt{2k_b T k^b}$ を常に満たす。

ブラウン動力学法の式より、 $\Delta \xi = \Delta \xi_{\text{ef}} + \Delta \xi_{\text{B}}$ と表される。ここで $\Delta \xi_{\text{ef}}$ は、粒子に働く外力に起因する移動であり、 $\Delta \xi_{\text{ef}} = F(\xi) D^T \Delta t / k_b T$ である。また、 $\Delta \xi_{\text{B}}$ は熱運動に起因する拡散移動であり、筆者は、 $\Delta \xi_{\text{B}}$ を確率的な拡散移動距離の二乗平均値の二乗根とし、 $\Delta \xi_{\text{B}} = \sqrt{2D^T \Delta t}$ と表した。 $\Delta \xi$ は、区間内において $\xi = \xi_{\text{low}}, \xi_{\text{up}}$ のときに最大となるので、 $k^b \Delta \xi \leq \sqrt{2k_b T k^b}$ を満たす Δt の範囲を求める為には、 $\xi = \xi_{\text{low}}, \xi_{\text{up}}$ のみを考慮すれば良い。つまり、この条件式は、 $F(\xi_{\text{up}}) = -k^b \sqrt{2k_b T / k^b}$ を用いて、以下のように記述される。

$$k^b \left(\left| \frac{D^T \Delta t}{k_b T} F(\xi_{\text{up}}) \right| + \sqrt{2D^T \Delta t} \right) \leq \sqrt{2k_b T k^b} \quad (197)$$

ここで、 $D^T = k_b T / 6\pi\eta a$ であり、 k_b はボルツマン定数、 T は系の温度である。最終的に、この式を解くと、

$$\Delta t \leq \left(\frac{3 - \sqrt{5}}{2} \right) \frac{6\pi\eta a}{k^b} = 20.6 \text{fs} \quad (198)$$

を得る。ここで、 η は、水の値 $\eta = 8.9 \times 10^{-4} \text{Pa} \cdot \text{s}$ を使用した。 a は、VDW モデルで表現した中間的な大きさのアミノ酸分子の形状を内包できるような一つの球の最小半径から概算し、 $a = 0.4 \text{nm}$ を使用した。また、 $k^b = 125.02 \text{J/m}^2$ を使用した。

S5-1-3 回転運動の場合

次に、粒子の中心を通る一つの軸周りの回転運動の場合において、 Δt の間で粒子に働くトルクは大きく変化しない、という条件を満たす Δt の範囲を考える。この事は、基本的に並進移動の場合と同じ考察によって行える。ただし以下の部分においては異なる。それは先ず、粒子の回転運動のみを考慮する事である。

具体的には、 \mathbf{n}^R を粒子の中心を通る一つの軸の単位ベクトルとし、 θ をその軸周りの回転移動を表す角度の座標とする。この場合、系全体のポテンシャル U^R は、 θ のみの関数として表され、 $U^R = U(\theta)$ と記述できる。粒子に働く回転軸の周りのトルクは、 $T = dU^R/d\theta$ となる。そして、 $i-1$ 番目と i 番目の粒子は、 $\theta = 0$ において $\mathbf{r}_i^{\text{an}} = \mathbf{r}_i^{\text{ac}}$ となるように配置されていると想定した (図 S5-1(B))。系のポテンシャルとして U_i^b のみを考慮し、 $U^R = (k^b/2)r^2$ 、 $r = |\mathbf{r}_i^{\text{ac}} - \mathbf{r}_i^{\text{an}}|$ とした。 i 番目の粒子の中心と \mathbf{r}_i^{ac} の間の距離を \hat{r}^{ac} とし、常に $r \ll \hat{r}^{\text{ac}}$ であると想定し、そして、 $r = \hat{r}^{\text{ac}} \theta$ という近似を用いた。以上の結果、並進運動における条件 B は、以下の条件 D に読み替えられる。

条件 D

$U^R(\theta) \leq k_b T$ を満たす任意の θ に対し、 $T_{\text{diff}} \leq T_c$ が満たされる。

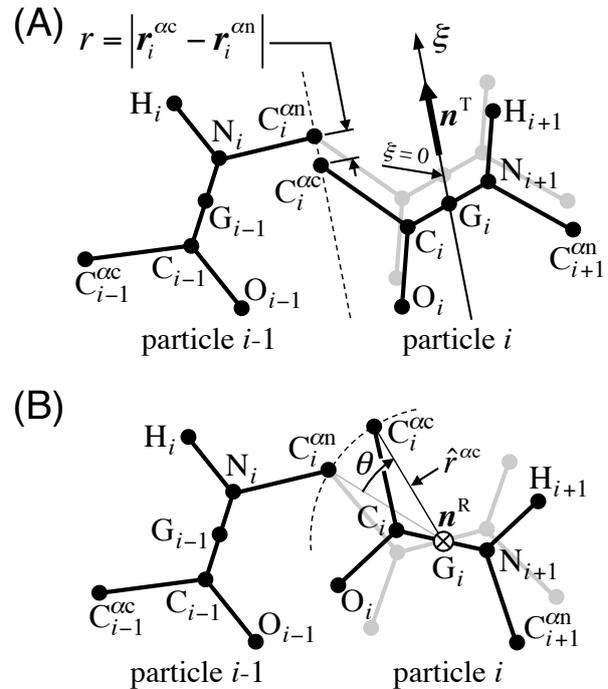


図 S5-1: (A) 粒子の並進運動から定められる時間刻み幅の上限を計算する為の、 $i-1$ 番目と i 番目の粒子の配置。(B) 粒子の回転運動から定められる時間刻み幅の上限を計算する為の、 $i-1$ 番目と i 番目の粒子の配置。

そして、この条件を満たす Δt の範囲は、 $T(\theta_{up}) = -\hat{r}^{ac} \sqrt{2k_b T k^b}$ を用いて、次式で表される。

$$k^b (\hat{r}^{ac})^2 \left(\left| \frac{D^R \Delta t}{k_b T} T(\theta_{up}) \right| + \sqrt{2D^R \Delta t} \right) \leq \hat{r}^{ac} \sqrt{2k_b T k^b} \quad (199)$$

ここで、 $D^R = k_b T / 8\pi a^3 \eta$ である。この式を解くと、次式を得る。

$$\Delta t \leq \left(\frac{3 - \sqrt{5}}{2} \right) \frac{8\pi a^3 \eta}{k^b (\hat{r}^{ac})^2} = 120\text{fs} \quad (200)$$

ここで、 η, a, k^b は、並進移動の場合と同じ値を、また、 $\hat{r}^{ac} = 190.7\text{pm}$ を用いた。

最終的に、粒子の並進移動及び回転移動において、それぞれ、 $\Delta t \leq 20.6\text{fs}$ 及び $\Delta t \leq 120\text{fs}$ という Δt の範囲が求められた。結果として、 $\tau_{upper} = 20.6\text{fs}$ が、適切な Δt の範囲の上限となった。

S5-2 時間刻み幅の決定

S5-1 の結果から、 $\Delta t \leq 20.6\text{fs}$ の範囲の時間刻み幅 Δt を用いるならば、本研究のシミュレーションモデルに対しブラウン動力学法を用いてシミュレーション系の軌跡を正確に追跡できると予想される。しかし、強制アンフォールディングシミュレーションを実行する為には、そのような範囲の Δt を用いて、実際に安定かつ十分正確なシミュレーションが行えるかどうかを調べ、最適な Δt を決定する必要がある。その為には、筆者は、様々な Δt の値を用いて、脂質膜の無い環境でのポリペプチド鎖の運動のシミュレーションを実行し、 $r_i = |r_i^{ac} - r_i^{an}|$ 及び N-C α -C 原子間結合角 θ_i の頻度分布を計算した。そして、頻度分布が Δt の変化によって大きく変化しない範囲で最大の Δt を、最適な Δt と決定した。

この補助的なシミュレーションは、強制アンフォールディングシミュレーションの場合と同様の手法を用い、以下の手順で実行された。系全体のポテンシャルとして、ポリペプチド鎖内部のポテンシャル項、 U^{pep} のみを考慮した。シミュレーションは全部で8通り行われ、それぞれにおいて、 Δt を 50fs, 40fs, 30fs, 20fs, 15fs, 10fs, 5fs, 2.5fs に設定した。そして、各シミュレーションはそれぞれ、以下の手順で実行され、解析された。

最初に、バクテリオロドプシンのポリペプチド鎖 (247 残基) の N 端粒子を、シミュレーション座標系の原点に固定した。そして、 $10\mu\text{s}$ の計算行つて初期構造の影響を取り除いた後、更に追加で $10\mu\text{s}$ のシミュレーションを行った。この追加の $10\mu\text{s}$ の結果から、等間隔で、合計 10000 個の構造を抽出した。これら全ての構造における全ての粒子の $r_i = |r_i^{ac} - r_i^{an}|$ と θ_i の値を集め、頻度分布を算出した (図 S5-2, S5-3)。

結果として、 $30\text{fs} \leq \Delta t$ では、系は発散したが、 $\Delta t \leq 25\text{fs}$ では安定なシミュレーションが行えた。そのような Δt の範囲において、 θ_i の相対頻度分布は、 Δt に関わらず、殆ど一致した。 $\Delta t = 2.5\sim 20\text{fs}$ の範囲では、 r_i の相対頻度分布は、大きく変化しないように見える。

正確なシミュレーションの為には小さな Δt が、また長時間のシミュレーションの為にはより大きな Δt が望まれる。この事を考慮して、筆者は、本研究のシミュレーションにおいて、 $\Delta t = 10\text{fs}$ を用いる事に決めた。

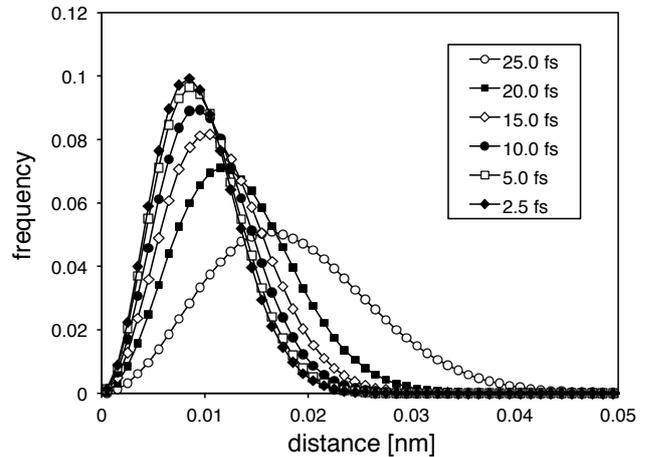


図 S5-2: 様々な Δt におけるシミュレーション結果において、全ての粒子についての $r_i = |r_i^{ac} - r_i^{an}|$ を集めた時の分布。横軸は r_i 、縦軸はその相対頻度。シミュレーションでは、座標 r_i^{ac} と r_i^{an} が一致するようなポテンシャルが与えられているけれども、粒子の熱運動により r_i^{ac} と r_i^{an} 間距離は決まった分布を持つ。

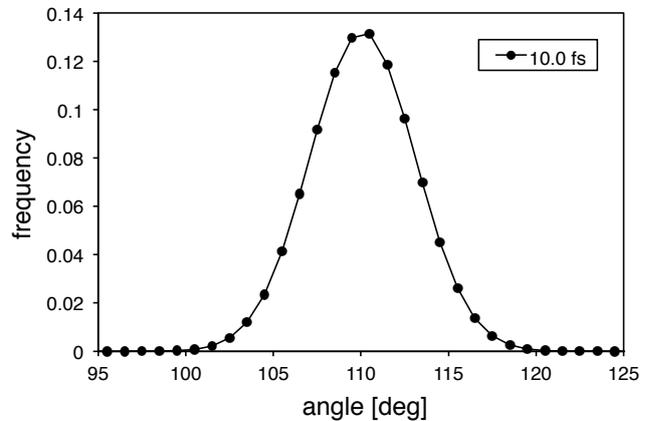


図 S5-3: $\Delta t = 10\text{ps}$ におけるシミュレーション結果において、全ての NC α C 原子間結合角 θ_i を集めた時の分布。横軸は θ_i 、縦軸はその相対頻度。 $\Delta t = 10\text{ps}$ の分布とそれ以外 Δt での分布との間の違いは、黒丸の印の直径程度である。

S6 膜貫通ヘリックスの安定性の検証

S6-1 シミュレーションによる検証

S6-1-1 概要

バクテリオロドプシン (bR) の強制アンフォールディングシミュレーションに用いる、脂質膜内部での水素結合エネルギーの値 $\Delta U^{\text{hb,m}}$ は、次のような方法で決定した。最初に、 $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の値を様々に変化させた上で、bR の引き抜きを行わず、単純に bR が膜中に存在するだけの補助的なシミュレーションを行なった。次に、bR に含まれる 7 本の膜貫通ヘリックス全てを長時間安定に存在させる事が出来るような $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の領域と、そうでない領域との境界を求めた。最終的に、その境界よりもわずかにヘリックスが安定に存在する側の値を、強制アンフォールディングシミュレーションに使用する $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の値とした。

S6-1-2 補助的なシミュレーションの実行

補助的なシミュレーションにおける系全体のポテンシャルは、強制アンフォールディングシミュレーションのものと、以下の二点を除いて同じである。二点のうち一方は、カンチレバーのエネルギー項 U^{cl} である。ここでは、膜タンパク質の引き抜きを行わないので $U^{\text{cl}} = 0$ とした。もう一方は、主鎖間の水素結合エネルギーポテンシャルの項 U^{hb} である。補助的なシミュレーションは、 U^{hb} の値を $-9.0k_{\text{B}}T$, $-9.5k_{\text{B}}T$, $-10.0k_{\text{B}}T$, $-10.5k_{\text{B}}T$, $-11.0k_{\text{B}}T$ とした場合の、合計 5 種類の条件下で実行した。その他の条件は、強制アンフォールディングシミュレーションを行う場合と同様とした。それ故、水中での水素結合エネルギーは、常に $-3.5k_{\text{B}}T$ である。

補助的なシミュレーションは、一つの条件につき、 $100\mu\text{s}$ の計算を乱数種を変化させて 4 回行った。計算の間、粗視化モデルによるポリペプチド鎖 (モデル鎖) の構造を、 100ns の間隔で、ポリグリシン鎖の原子構造として、PDB ファイル形式に出力した。各シミュレーションにつき、シミュレーション全体を通して、各アミノ酸残基が α ヘリックス構造を形成している時間の比率 (以下、 α ヘリックス形成率と呼ぶ) を計算した。ただし、初期構造の影響を除くため、各シミュレーションの最初の $10\mu\text{s}$ の結果は、計算に含めなかった。4 回のシミュレーションの結果を平均したものを、最終的な各残基の α ヘリックス形成率とした。シミュレーション結果の各フレームにおいて、各アミノ酸残基がどのような二次構造

を取っているかという事は、STRIDE プログラム [47, 63] を用いて評価した。このプログラムは、PDB ファイル形式のポリペプチド鎖の原子構造を必要とする。そのため、各フレームごとに、モデル鎖の構造をポリグリシン鎖の原子構造に変換し、PDB ファイル形式に出力して使用した。

S6-1-3 膜貫通ヘリックス形成領域の比較

各アミノ酸の α ヘリックス形成率が脂質膜内部での水素結合エネルギーによって変化する様子を、図 S6-1 に示した。 $\Delta U^{\text{hb,m}} \leq -10k_{\text{B}}T$ の条件下では、 α ヘリックス形成率が 90% 以上となるアミノ酸残基は、互いに離れ、かつ連続な 7 つの領域を形成していた。さらに、この条件下では、シミュレーション全体を通して 7 本の膜貫通ヘリックス構造が保たれている事を目視で確認した。一方、 $-9.5k_{\text{B}}T \leq \Delta U^{\text{hb,m}}$ の条件下では、一本以上のヘリックスが崩壊しかけていた。筆者は、 $\Delta U^{\text{hb,m}} = -10k_{\text{B}}T$ の条件下で、追加のシミュレーションを 4 回行ったが、得られた結果に違いは無かった。つまり、 $\Delta U^{\text{hb,m}} = -10k_{\text{B}}T$ の条件下では、7 本の膜貫通ヘリックスは十分安定に存在できると考えてよい。以上の事から、7 本の膜貫通ヘリックスの安定性の境界は、 $-9.5k_{\text{B}}T$ と $-10.0k_{\text{B}}T$ の間にあると考えられる。タンパク質は、安定な状態と不安定な状態との境界付近から、やや安定な側に存在していると考えられている [48]。そこで筆者は、bR の強制アンフォールディングシミュレーションに用いる $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の値を $-10k_{\text{B}}T$ に定めた。

図 S6-1 を観察すると、 α ヘリックス形成領域は、シミュレーションと天然構造の間で多少違いがある事が分かる。特に、B ヘリックス領域の違いは大きい。天然構造中で BC ループに含まれる β シートの部分が、シミュレーション中では B ヘリックス及び、C ヘリックスに加わっている。本研究では、 α ヘリックスの形成に関与する主鎖間の水素結合だけが考慮され、他の水素結合の存在は無視された。ヘリックス形成領域の違いは、このような想定によって引き起こされた可能性がある。しかし、本研究ではヘリックス形成領域の違いについて、これ以上の解析は行わなかった。

S6-2 水素結合エネルギーの妥当性の検証

S6-2-1 水素結合の輸送に伴う自由エネルギー変化

筆者は、上記において決定した $\Delta U^{\text{hb,m}}$ の値の妥当性を検証した。値の検証方法は、その値を決定した方法と異なっているべきである。それ故、筆者は、 $\Delta G_{\text{hb}}^{\circ}$ の値

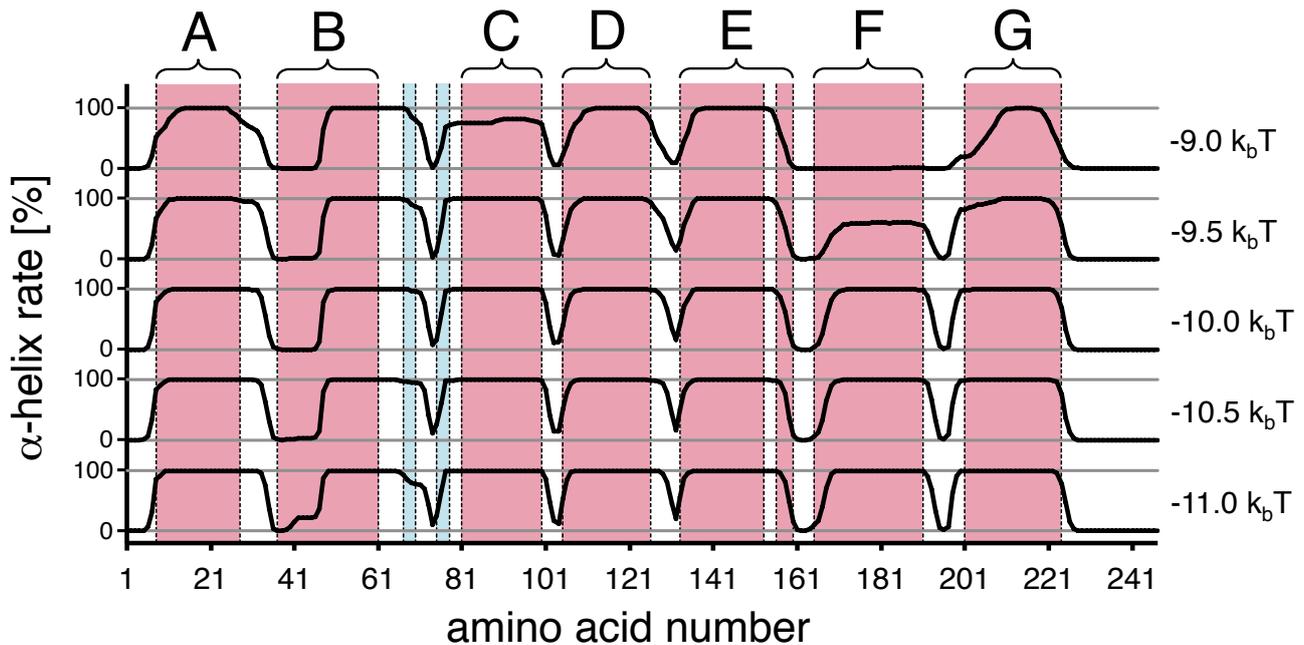


図 S6-1: 異なる膜中での水素結合エネルギーポテンシャルを用いて計算した場合の、各アミノ酸ごとの α ヘリックス形成率。横軸はアミノ酸残基番号を表し、縦軸は各アミノ酸の α ヘリックス形成率を表す。右側の数字は、膜中での水素結合エネルギーであり、ここで k_B はボルツマン定数、 T は温度である。シミュレーションは 300K にて行った。形成率のグラフの背後の桃色の帯は、天然構造における膜貫通領域を表す。この領域は、PDBID:1BRR に記述されている bR の二次構造情報から、chain A, B, C の全ての鎖において α ヘリックスを形成していると記述されている領域を使用した。図の上部のアルファベットは、各桃色の帯に対応するヘリックスの名称を表す。背後の水色の帯は、天然構造において β シートを形成している領域 (BC ループの部分) を表す。この領域も、ヘリックス領域の場合と同様の手順で決定した。

を、実験とシミュレーションの間で比較した。ここで、 ΔG_{hb}° とは、水中で水素結合 ($C=O \cdots H-N$) した状態にあるポリペプチド主鎖の $C=O$ 基と $H-N$ 基を、水素結合した状態を保ちながら膜中へ輸送する事に伴って生じる系の自由エネルギー変化である。

本研究のシミュレーション系においては、この自由エネルギーの値は明示的に指定出来るものではなく、 $\Delta U^{hb,m}$ 並びに他のポテンシャル定数の関係性から自然に導出される。それ故、シミュレーション系の ΔG_{hb}° の値が、実験的に測定された ΔG_{hb}° の値と一致するならば、そのような値の一致は $\Delta U^{hb,m}$ の値の妥当性を示す一つの証拠となる。

筆者は、先行研究 [44, 64, 65, 66, 64, 67, 68, 69] を調査した結果、現実のポリペプチド鎖における ΔG_{hb}° の値は、 $+2.59\text{kJ/mol} \sim +2.09\text{kJ/mol}$ である事が分かった (S6-2-2 を見よ)。また、本研究のシミュレーション系での ΔG_{hb}° の値を算出した結果、それは $+4.04\text{kJ/mol}$ であると分かった (S6-2-3 を見よ)。両者の値の違いは十分に小さい。それ故、筆者は、上記で算出した $\Delta U^{hb,m}$ の値は妥当であると考えた。

S6-2-2 現実のポリペプチド鎖における ΔG_{hb}° の値

ΔG_{hb}° の値を直接的に計測する事は困難である。そこで、Klotz 等は、N-methylacetamide(NMA, $\text{CH}_3\text{-CONH-}$

CH_3) 分子のとある熱力学サイクルを使って、 ΔG_{hb}° の値を算出した [44]。この方法は、Klotz 等及び Roseman の論文 [44, 64] を参考にして、次のように説明される。

まず、NMA 分子が有機溶媒中及び水中に溶解している二相系を考える (図 S6-2 を見よ)。NMA は、主鎖の単位のモデルとして一般的に使用されており、ある NMA 分子の $C=O$ 基と他の NMA 分子の $H-N$ 基の間に形成される水素結合 ($C=O \cdots H-N$) は、主鎖の単位間に形成される水素結合と見なす事ができる。次に、NMA 分子間の水素結合について、次の四つの状態を定義する (図 6-2 を見よ)。即ち、 $C=O$ 基と $H-N$ 基が、有機溶媒中で水素結合を形成している状態 (I)、していない状態 (II)、そして、水中で水素結合を形成していない状態 (III)、している状態 (IV) である。さらに、状態 I \rightarrow 状態 II への状態変化に伴う系の標準自由エネルギー変化を ΔG_1° 、II \rightarrow III のそれを ΔG_2° 、III \rightarrow IV のそれを ΔG_3° 、IV \rightarrow I のそれを ΔG_4° と定義する。ここで、状態 I \rightarrow II \rightarrow III \rightarrow IV \rightarrow I という熱力学サイクルを考えると、次式が成り立つ。

$$\Delta G_4^\circ = -(\Delta G_1^\circ + \Delta G_2^\circ + \Delta G_3^\circ) \quad (201)$$

この式の、 ΔG_4° は ΔG_{hb}° に対応する。つまり、この式の右辺の三つの値を調べる事で、 ΔG_{hb}° の値が算出できる。

本研究で使用したアミノ酸残基の膜への親和性を表現するポテンシャルは、オクタノール-水分配係数より導いた。それ故、 ΔG_4° の値の算出は、オクタノール-水系に

おいて行うべきである。しかしながら、筆者は、オクタノール-水系における ΔG_4° の測定値を見つけれなかった。そこで、次の想定を行い、 ΔG_4° の値を予想した。その想定とは、有機溶媒の疎水性に関する事である。四塩化炭素は、オクタノールよりも疎水的な環境を提供すると考えられる。また、POPC 界面は、オクタノールと同等か、それよりも疎水的でない環境を提供すると考えられる。それ故、オクタノール-水系における ΔG_4° の値は、四塩化炭素-水系のそれと、POPC 界面-水系のその間にあると推測できる。

Klotz & Farnham 等は、四塩化炭素-水系において ΔG_1° 、 ΔG_2° 、 ΔG_3° を計測または算出し、 ΔG_4° を算出した [65]。その後、 ΔG_1° の値は Kresheck & Klotz によって修正された [66]、 ΔG_2° の値は、Roseman によって修正された [64]。そして、最終的に Roseman は、四塩化炭素-水系において $\Delta G_4^\circ = +2.59\text{kJ/mol}$ 、と算出した。また、POPC 界面-水系については White 等 [67]、Ladokhin 等 [68]、White 等 [69] の研究によって、 $\Delta G_4^\circ \approx +2.1\text{kJ/mol}$ という値が得られている。結果として、筆者は、オクタノール-水系における $\Delta G_{\text{hb}}^\circ$ の値は、 $+2.59\text{kJ/mol} \sim +2.1\text{kJ/mol}$ の範囲にあると推測した。

S6-2-3 シミュレーション系における $\Delta G_{\text{hb}}^\circ$ の値

本研究のシミュレーション系における $\Delta G_{\text{hb}}^\circ$ の値もまた、上記と同じ熱力学的サイクルを使用して求める事ができる。つまり、NMA の代わりにペプチド結合粒子が溶解している二相系について考察すればよい。

この二相系の ΔG_1° の値は、図 S2-3 を用いて算出できる。図 S2-3 は、ペプチド結合粒子間の水素結合の形成に伴う標準自由エネルギー変化と、膜中での水素結合エネルギーの値の関係性を表現している。筆者は、シミュレーション系における膜中での水素結合エネルギーの値 $\Delta U^{\text{hb},m}$ を $-10.0k_bT$ とした。それ故、図 S2-3 から $r_{\text{lim}}^{\text{hb}} = 1.5\text{\AA}$ かつ $\Delta U = -10.0k_bT$ となる値を捜す事によって、 $\Delta G_1^\circ = -2.89\text{kJ/mol}$ が得られる。

ΔG_2° は、-CONH-フラグメントの膜中から水中への輸送エネルギーに等しい。-CONH-のフラグメント定数は、>CH-CONH-のフラグメント定数-2.18 から >CH-のフラグメント定数を引く事によって得られる。>CH-のフラグメント定数を 0.3 とするなら、-CONH-のフラグメント定数は-2.48 となる。そして、フラグメント定数と輸送エネルギーの関係から、 $\Delta G_2^\circ = -14.15\text{kJ/mol}$ が得られる。

ΔG_3° の値は、水中での水素結合の形成に伴う標準自由エネルギー変化である。本研究では、シミュレーション系のこの値は、Klotz 等の NMA の結果と一致するよ

うに設定した (S2-3 を見よ)。それ故、Klotz 等と同じ値 $\Delta G_3^\circ = 13.0\text{kJ/mol}$ を用いてよい。

以上の値を式 201 に代入する事によって、 $\Delta G_4^\circ = \Delta G_{\text{hb}}^\circ = +4.04\text{kJ/mol}$ が得られる。

$r_{\text{lim}}^{\text{hb}}$ の値及びその他のポテンシャル定数の誤差を考慮すると、シミュレーション系の $\Delta G_{\text{hb}}^\circ$ の値 $+4.04\text{kJ/mol}$ は、オクタノール-水系において推測された $\Delta G_{\text{hb}}^\circ$ の値 $+2.59 \sim +2.1\text{kJ/mol}$ とよく一致している。それ故、筆者は、シミュレーションモデルにおける $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}$ の輸送自由エネルギーは、妥当な値となっていると判断した。

S7 ポリペプチド鎖に働く粘性抵抗力

S7-1 ポリペプチド鎖に働く粘性抵抗力の影響

膜タンパク質の強制アンフォールディング実験では、bR を構成しているポリペプチド鎖が脂質膜から引き出される。引き出されたポリペプチド鎖は、カンチレバーの移動に伴って水中を引きずられる。このときポリペプチド鎖には、移動方向と反対の方向の粘性抵抗力が働く。この粘性抵抗力が大きいと、計測される F-D 曲線の形状は歪み、解析は困難なものとなる。引き抜きを低速度で行えば、この粘性抵抗力は減少し、F-D 曲線の形状の歪みを防ぐ事が出来る。実際の強制アンフォールディング実験は、この粘性抵抗力が殆ど無視できるような引き抜き速度で行なわれている。

強制アンフォールディングのシミュレーションにおいても、同様の理由から、引き抜きを低速度で行う事が望ましい。しかし、これには計算量の増大が伴う。つまり、強制アンフォールディングのシミュレーションを適切に実行する為には、以下の二つの条件を満たす引き抜き速度を予め選択する必要がある。一方は、ポリペプチド鎖に働く粘性抵抗力が十分小さくなる事である。もう一方は、計算コストが大きくなりすぎない事である。

筆者は、本研究のシミュレーションモデルの為の最適なカンチレバーの移動速度を、補助的なシミュレーションによって調査した。具体的には、完全にアンフォール

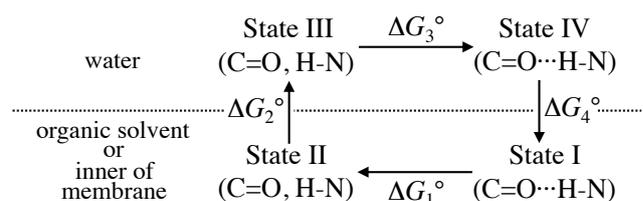


図 S6-2: N-メチルアセトアミド分子の輸送及び水素結合の形成に伴う標準自由エネルギー変化の熱力学的サイクル。図は、Roseman の論文の図 [64] を元に構成した。

ドしたバクテリオロドプシン (BR) と同じ長さのポリペプチド鎖を、様々な速度で移動させ、移動速度と粘性抵抗力の関係を調べた。その結果、筆者は、 $v^{cl} = 1\text{mm/s}$ の条件が適切であると判断した。

S7-2 補助的なシミュレーションの実行

補助的なシミュレーションにおける系全体のポテンシャル U^{sys} は、次式で表した。

$$U^{sys} = U^{pep} + U^{cl} \quad (202)$$

ここで、 U^{pep} はポリペプチド鎖内部エネルギーを表すポテンシャル項であり、 U^{cl} はカンチレバーの歪みエネルギーを表すポテンシャル項である。両ポテンシャル項は、BR の強制アンフォールディングのシミュレーションに用いられるのものと同一である。カンチレバーの移動速度 v^{cl} は、0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 及び 100.0mm/s とした。その他の条件は、強制アンフォールディングのシミュレーションの場合と同様である。

補助的なシミュレーションは、各 v^{cl} につき、一度ずつ、以下の手順で実行した。まず、247 残基の長さの粗視化モデルによるポリペプチド鎖を、シミュレーション空間中に配置した。初期構造として、“時間刻みの決定”において $\Delta t = 10\text{fs}$ の場合に使用したものをを用いた。次に、カンチレバーにより、ポリペプチド鎖の N 末端を z 軸の正の方向へ、 $100\mu\text{s}$ の間、定められた速度 v^{cl} で移動させた。最終的に、時間 t とカンチレバーに働く力の

大きさ F の関係を記録した。

S7-3 粘性抵抗力の大きさ

F は、どの v^{cl} においても、 $t = 20\mu\text{s}$ までの間に上昇し、ほぼ一定の値に収束した。そこで、 $t = 20\sim 100\mu\text{s}$ の区間での F の平均値 \bar{F} を算出し、これをポリペプチド鎖に働く粘性抵抗力と見なした。 v^{cl} が小さい場合、熱運動の影響によって、 F の値は時刻 t に対して大きく変化した。そのため、 F の揺らぎの範囲を以下の手順で評価した。まず、 $t = 20\sim 100\mu\text{s}$ の区間を 8 つに均等に区切り、その区間ごとの F 平均値を算出した。そして、それら 8 区間の平均値の標準偏差を求め、全平均値の揺らぎの目安とした。

図 S7-1 に、カンチレバーの移動速度 v^{cl} と、ポリペプチド鎖の粘性抵抗力 \bar{F} の関係を示した。この結果から、 v^{cl} が 1.0mm/s 以下ならば、 \bar{F} は約 3pN か、それ以下となる事が分かる。ポリペプチド鎖の長さが長いほど、この粘性抵抗力は大きくなる。それ故、アンフォールディング途中での粘性抵抗力の大きさは、このようにして調べた値よりも常に小さいと推定できる。

3pN の大きさの粘性抵抗力は、F-D 曲線の形状に影響をほとんど与えないと考えられる。最終的に、筆者は、 $v^{cl} = 1\text{mm/s}$ の条件が、BR の強制アンフォールディングシミュレーションに用いるカンチレバーの移動速度として適切であると判断した。

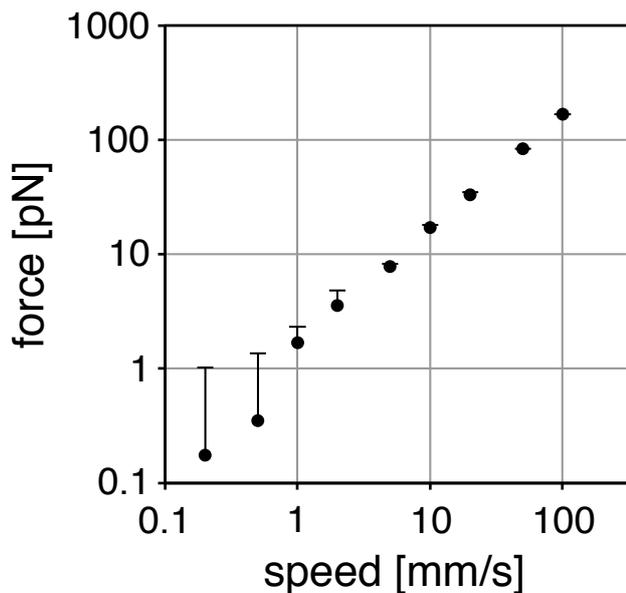


図 S7-1: カンチレバーの移動速度と、ポリペプチド鎖の粘性抵抗力の関係。横軸はカンチレバーの移動速度 (対数表示)、縦軸はカンチレバーに働く力の平均値 (対数表示)。力の平均値の誤差の目安は、各シミュレーションの結果を表す黒丸の上部に棒で示した。

S8 ポリペプチド鎖の伸張特性

S8-1 ポリペプチド鎖の伸張特性の重要性

筆者は、本研究で開発したポリペプチド鎖の粗視化モデル (以下ではモデル鎖と呼ぶ) の伸張特性を調査した。なぜなら、それは、膜タンパク質の強制アンフォールディングシミュレーションにおいて、以下の二種類の事柄に影響を及ぼすと考えられるからである。一方は、負荷速度 r_f 、即ち、単位時間あたりの架橋鎖の張力の増加量である。 r_f が変化すると力のピークの大きさの最頻値 F^* が変化する。この影響は、 F^* が $\ln r_f$ に比例する [20] 事から、それほど大きくないと考えられる。もう一方は、大きなエネルギー障壁を乗り越えた直後における架橋鎖の緩和度合いである。この事は、大きなエネルギー障壁の直後に存在する小さなエネルギー障壁によって出現する力のピークの出現頻度を大きく左右し得る。例えば、大きなエネルギー障壁の直後において架橋鎖が非常に緩和しているならば、次に出くわす小さなエネルギー障壁

によって力のピークが出現する頻度は高くなると考えられる。逆に、大きなエネルギー障壁の直後において架橋鎖があまり緩和しておらず、高い張力を保っているのならば、次に出くわす小さなエネルギー障壁は瞬時に乗り越えられ、力のピークは出現しなくなると考えられる。

このサポーター材料では、モデル鎖の伸張特性を、補助的なシミュレーションによって調査した。具体的には、モデル鎖の両端を徐々に引き離すシミュレーションを行った。そして、両端の間の直線距離 D と、鎖の張力によって両端の間に働く引力 F の関係を連続的に記録し、F-D 曲線を作成した。その結果、モデル等の伸張特性は、Worm-Like Chain(WLC) モデルで表現された現実のポリペプチド鎖の伸張特性を良く再現している事が分かった。

S8-2 補助的なシミュレーションの実行

モデル鎖の伸張特性を評価する為の補助的なシミュレーションは、以下の手順で行った。

まず、シミュレーション系の全エネルギーポテンシャル U^{sys} を、次式で記述した。

$$U^{sys} = U^{pep} + U^{cl} \quad (203)$$

ここで、 U^{pep} は、ポリペプチド鎖の内部のエネルギーを表現するポテンシャル項である。また、 U^{cl} は、カンチレバーの撓みエネルギーを表現するポテンシャル項である。これらのポテンシャル項は、BR の強制アンフォールディングシミュレーションに使用されるものと同じである。

次に、強制アンフォールディングシミュレーションに用いるものと同じ 247 残基の長さのモデル鎖を、シミュレーション空間中に配置した。モデル鎖の N 端粒子は、シミュレーション座標系の原点に固定した。

さらに、C 端粒子を、N 端粒子のそばから、 $v^{cl} = 0.9\text{mm/s}$ の速度で、 z 軸上方へ、カンチレバーを用いて移動させた。この間、 F と D の関係を連続的に記録し、F-D 曲線を作成した。

このシミュレーションを 8 回行い、得られた 8 本の F-D 曲線を平均して、最終的に一つの曲線を得た。上記のシミュレーションを、通常条件によるシミュレーションと呼ぶ。

これに加えて、筆者は次のようなシミュレーションを行った。それは、 C_i^{an} と C_i^{ac} 間の距離を 0 付近に拘束するポテンシャルに含まれる定数 k^b の値、及び、原子間結合角 $\angle N_i C_i^a C_i$ を拘束するポテンシャルに含まれる定数 k^a の値を半減させたシミュレーションである (以下、減衰させた条件によるシミュレーションと呼ぶ)。

通常条件によるシミュレーションでは、 $k^b = 125.02\text{J/m}^2$ 、及び、 $k^a = 1.516 \times 10^{-18}\text{J/m}^2$ を使用する。これに対して、減衰させた条件によるシミュレーションでは、 $k^b = 62.51\text{J/m}^2$ 、及び、 $k^a = 0.758 \times 10^{-18}\text{J/m}^2$ を使用する。減衰させた条件によるシミュレーションは、通常条件によるシミュレーションと同様に行われ、最終的に一つの F-D 曲線を得た。

比較の対象として、WLC モデル [70, 6] によって表現された現実のポリペプチド鎖の伸張特性を用いた。この伸張特性は、次式で表される。

$$F(x) = \frac{k_b T}{A} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right] \quad (204)$$

ここで、 F はポリペプチド鎖の張力、 x はポリペプチド鎖の両端間の直線距離、 L は鎖に沿った長さ (即ち、ポリペプチド鎖のアミノ酸残基数 (247) \times モノマー長 (0.36nm))、 A は鎖の持続長 (0.4nm)、 k_b はボルツマン定数、 T は系の温度であり、298K を使用した。

S8-3 伸張特性の比較

図 S8-1 において、二種類の条件下のシミュレーションで求められたモデル鎖の F-D 曲線を、現実のポリペプチド鎖の F-D 曲線と比較した。その結果、通常条件によるシミュレーションで得られた F-D 曲線の D を 7% 縮めると、全体的に現実のポリペプチド鎖の F-D 曲線によく一致する事がわかった (図には記載せず)。また、通常条件においてモデル鎖が 100pN の張力を生じる為には、現実のポリペプチド鎖より約 6% 余計に引き伸ばす必要がある事が解った。両者の伸張特性の違いは、本

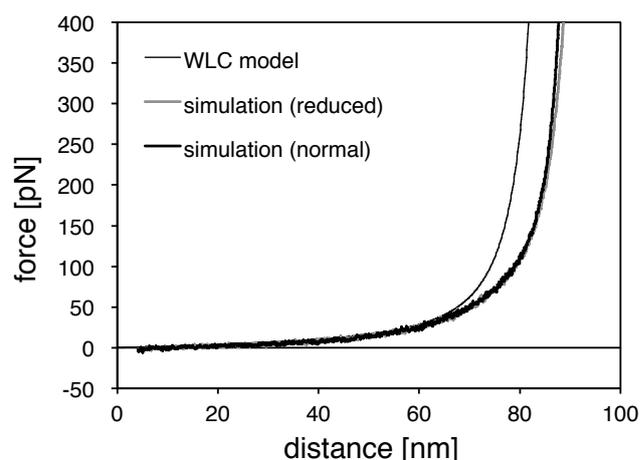


図 S8-1: ペプチド結合粒子モデルによるポリペプチド鎖の伸張特性と、WLC モデルで表された現実のポリペプチド鎖の伸張特性の比較。横軸は、ポリペプチド鎖の両端間の距離、縦軸はポリペプチド鎖の張力を表す。太い黒線は、標準的なペプチド粒子間の結合定数を用いた条件における計算結果、太い灰色の線はペプチド粒子間の結合定数を半減させた条件における計算結果を表す。細い黒線は、WLC モデルによって表された現実のポリペプチド鎖の伸張特性を表す。

研究の目的の上では、十分に小さいと考えられる。それ故、筆者は、通常条件におけるモデル鎖の伸張特性が、bR の強制アンフォールディング過程に与える影響は、十分に小さいと結論した

加えて筆者は、モデル鎖と現実のポリペプチド鎖の間で、伸張特性に違いが生じる原因について考察した。 k^b 及び k^a の値を半減させた条件を用いても、F-D 曲線は、通常の条件の場合からほとんど変化しない (図 S8-1 を見よ)。このことから、伸張特性の違いは、 k^b 及び k^a の不正確さに起因するのではないと考えられる。

伸張特性に違いが生じた原因としては、以下のような事が考えられる。(i) 主鎖の原子間、または、主鎖の原子と側鎖の原子 (主に C^β 原子) 間の衝突によって生じる主鎖の二面角 ϕ, ψ の制限を無視した事。(ii) 主鎖の二面角 ϕ, ψ によって記述されるポテンシャルエネルギー項を無視した事。(iii) 水分子を明示的に考慮しなかった事。筆者は、(i) の影響が最も大きそうだと考えている。しかしながら、本研究ではこれ以上の調査は行わなかった。

S9 シミュレーションのスケールの変換

S9-1 概要

本文章では、本研究のシミュレーション結果を実験結果と比較する際に生じうる問題について考察した。その結果、シミュレーションのスケール変換 (シミュレーションの相似性) を考慮するならば、問題は生じなさそうであると判断した。

本研究のシミュレーションにおいて用いられた膜タンパク質の引き抜き速度 ($v^{cl} = 1.0\text{mm/s}$) は、実験で一般的に用いられる速度 (概ね $v^{cl} = 1000\text{nm/s}$) よりも約 1000 倍大きい。また、本研究では、脂質膜の粘性率を水と同一の $\eta = 0.00089\text{Pa}\cdot\text{s}$ と想定したが、実際の脂質膜の粘性率はこの値よりも遥かに大きそうである。それ故、シミュレーションと実験の間で結果を比較する際には、何らかの不都合を生じるように思える。

そこで筆者は、シミュレーションのスケールの変換法則について考察した。その結果、本研究の範囲においては、溶媒の粘性率 $\eta = \eta_1$ 、時間間隔 $\Delta t = \Delta t_1$ 、及び、引き抜き速度 $v^{cl} = v_1^{cl}$ を用いて行われたシミュレーションの結果を、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ 、及び、 $v_1^{cl} \cdot \Delta t_1 = v_2^{cl} \cdot \Delta t_2$ という二つの条件を満たす、異なる条件 η_2 、 Δt_2 、及び、 v_2^{cl} を用いて行われたシミュレーションの結果と同一視する事が出来る、と言う事が分かった。

このスケール変換の法則は次の事を意味する。それは、

$\eta = 0.00089\text{Pa}\cdot\text{s}$ 、 $\Delta t = 10\text{fs}$ 、及び、 $v^{cl} = 1.0\text{mm/s}$ の条件下で計算された本研究のシミュレーション結果を、 $\eta = 0.89\text{Pa}\cdot\text{s}$ 、 $\Delta t = 10\text{ps}$ 、及び、 $v^{cl} = 1000\text{nm/s}$ の条件下で計算されたシミュレーション結果と見なしてよい、と言う事である。ここで、膜タンパク質の引き抜き速度、概ね 1000nm/s は、実験で用いられる値である。また、粘性率 $0.89\text{Pa}\cdot\text{s}$ は、紫膜中の脂質の拡散速度を基準として算出された紫膜の粘性率として妥当な値である。さらに、時間刻み $\Delta t = 10\text{ps}$ は、 $v^{cl} = 1000\text{nm/s}$ 及び $0.89\text{Pa}\cdot\text{s}$ という条件下でブラウン動力学法に基づいたシミュレーションを行う為に問題の無い値である。つまり、スケール変換の法則を適用すれば、本研究の結果は、実際の実験の条件と類似したシミュレーションの結果と見なせそうであると考えられる。

スケール変換の具体的な証明は、3つの部分に分けて記述した。先ず、このスケール変換が、数値計算上は完全に正しいと言う事を、S9-2 に記述した。次に、このスケール変換が、物理的にも適切である事を S9-3 に記述した。さらに、その他の疑問点については、S9-4 に記述した。加えて、力のピークの大きさと、引き抜き速度及び膜の粘性率の関係性について、このスケール変換が意味する事を考察した。

S9-2 数値計算上における結果の同一性

S9-2-1 同一のシミュレーション結果を導く条件

本研究の範囲においては、 n ステップ目のシミュレーション中の時刻 t は、時間刻み Δt を用いて、 $t = n\Delta t$ と表せる。それ故、時刻 t でのシミュレーション系の状態 $q(t)$ は、 $q(n\Delta t)$ と表される。ここで新たに、 n ステップ目のシミュレーション系の状態を次式で定義する。

$$q^n = q(n\Delta t) . \quad (205)$$

すると、本研究のシミュレーション結果は、 $q^0, q^1, \dots, q^n, \dots$ という逐次的な系の状態の集まりとして表す事ができる。

以下では、シミュレーションに与える条件のうち、時間刻み Δt 、溶媒の粘性率 η 、及び膜タンパク質の引き抜き速 v^{cl} という三つの条件を纏めて $(\Delta t, \eta, v^{cl})$ と表す。本研究で行うシミュレーションの範囲においては、初期状態 q^0 が同一であり、 $(\Delta t, \eta, v^{cl})$ 以外の全ての条件が同じである場合、次の定理が成り立つ。

定理 A

$(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{cl})$ という条件下において計算したシミュレーション系の逐次的状態 $q^0, q^1, \dots, q^n, \dots$ は、 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{cl})$

という条件下において計算したそれらと、以下の二つの条件を共に満たす場合、数値計算上は完全に一致する。

$$\frac{\Delta t_1}{\eta_1} = \frac{\Delta t_2}{\eta_2}, \quad (206)$$

$$v_1^{\text{cl}} \cdot \Delta t_1 = v_2^{\text{cl}} \cdot \Delta t_2. \quad (207)$$

定理 A は、以下のようにして証明できる。まず、とある系の状態 $q(t)$ から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ を用いて算出した系の状態 $q(t + \Delta t_1)$ が、同じ $q(t)$ から条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ を用いて算出した系の状態 $q(t + \Delta t_2)$ と一致する為の条件を調べる。系の状態 q は全ての粒子の位置 \mathbf{r}_i と向き \mathbf{A}_i 、並びに、カンチレバーの根元の座標 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ によって定められる。それ故、そのような条件は、以下の三つを共に満たすような条件である。

(i) $\mathbf{r}_i(t)$ から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ を用いて算出される $\mathbf{r}_i(t + \Delta t_1)$ が、 $\mathbf{r}_i(t)$ から条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ を用いて算出される $\mathbf{r}_i(t + \Delta t_2)$ と一致する事。

(ii) $\mathbf{A}_i(t)$ から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ を用いて算出される $\mathbf{A}_i(t + \Delta t_1)$ が、 $\mathbf{A}_i(t)$ から条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ を用いて算出される $\mathbf{A}_i(t + \Delta t_2)$ と一致する事。

(iii) $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t)$ から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ のもとに導かれる $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t + \Delta t_1)$ が、 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t)$ から条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ のもとに導かれる $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t + \Delta t_2)$ と一致する事。

次に、筆者は、(i), (ii), 及び (iii) を満たす為に必要な条件について考察し、その条件とは、それぞれ、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ (S9-2-2 を見よ)、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ (S9-2-3 を見よ)、および、 $v_1^{\text{cl}} \cdot \Delta t_1 = v_2^{\text{cl}} \cdot \Delta t_2$ (S9-2-4 を見よ) であると分かった。これらの条件は、最終的に式 (206) かつ式 (207) と纏められる。

上記の事から、(a) 式 (206) 及び式 (207) が満たされる場合、同一の n ステップ目の系の状態 q^n から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ のもとに計算した q^{n+1} が、条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ の下に計算した q^{n+1} と一致する事が示された。さらに、定理 A は、(b) 初期状態 q^0 が同一である事を前提としている。それ故、最終的に、(a) 及び (b) より、数学帰納法によって定理 A は証明された。

S9-2-2 同一の粒子の位置を算出する条件

S4 の式 (184)、式 (185)、式 (186)、及び、式 (187) より、 i 番目の粒子の時刻 t における位置 $\mathbf{r}_i(t)$ から時刻 $t + \Delta t$ での位置 $\mathbf{r}_i(t + \Delta t)$ を算出する計算は、 $D^T \Delta t$ という一つの定数のみに依存し、 D^T 及び Δt のそれぞれに個別に依存するのではないと言う事が分かる。 $D^T \Delta t$ は、粒子の並進運動の拡散定数であり、具体的に、次式で表

される。

$$D^T \Delta t = \frac{k_b T}{6\pi a} \left(\frac{\Delta t}{\eta} \right). \quad (208)$$

ここで、右辺のそれぞれの定数は、S4-2 に記述したものと同一である。式 (208) より、 $\mathbf{r}_i(t)$ から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ のもとで算出した $\mathbf{r}_i(t + \Delta t_1)$ と、条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ のもとで算出した $\mathbf{r}_i(t + \Delta t_2)$ は、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ であるときに、互いに一致する事が分かる。

S9-2-3 同一の粒子の向きを算出する条件

S4 の式 (188)、式 (189)、式 (190)、式 (191)、及び、式 (192) より、 i 番目の粒子の時刻 t における向き $\mathbf{A}_i(t)$ から時刻 $t + \Delta t$ での向き $\mathbf{A}_i(t + \Delta t)$ を算出する計算は、 $D^R \Delta t$ という一つの定数のみに依存し、 D^R 及び Δt のそれぞれに個別に依存するのではないと言う事が分かる。 $D^R \Delta t$ は、回転運動における拡散定数であり、具体的に、次式で表される。

$$D^R \Delta t = \frac{k_b T}{8\pi a^3} \left(\frac{\Delta t}{\eta} \right). \quad (209)$$

ここで、右辺のそれぞれの定数は、S4-2 に記述したものと同一である。式 (209) より、 $\mathbf{A}_i(t)$ から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ のもとで算出した $\mathbf{A}_i(t + \Delta t_1)$ と、条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ のもとで算出した $\mathbf{A}_i(t + \Delta t_2)$ は、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ であるときに、互いに一致する事が分かる。

S9-2-4 同一のカンチレバーの根元の座標を与える条件

本研究では、カンチレバーの根元の座標 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}$ の時間発展の式は次のように記述できる。

$$\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t + \Delta t) = \mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t) + (v^{\text{cl}} \Delta t) \mathbf{z} \quad (210)$$

ここで、 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t)$ 及び $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t + \Delta t)$ は、それぞれ、時刻 t 及び $t + \Delta t$ におけるカンチレバーの根元の座標であり、 \mathbf{z} は、 z 軸の単位ベクトルである。 v^{cl} は、カンチレバーの根元の移動速度である。この式より、 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t)$ から $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t + \Delta t)$ を算出する計算は、 $v^{\text{cl}} \Delta t$ という一つの定数のみに依存し、 v^{cl} 及び Δt のそれぞれに個別に依存するのではないと言う事が分かる。それ故、 $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t)$ から条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ のもとで算出した $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t + \Delta t_1)$ と、条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ のもとで算出した $\mathbf{r}_{\text{base}}^{\text{cl}}(t + \Delta t_2)$ は、 $v_1^{\text{cl}} \Delta t_1 = v_2^{\text{cl}} \Delta t_2$ であるときに、互いに一致する事が分かる。

S9-3 シミュレーションと実験の直接的な比較

S9-3-1 ブラウン動力学法の使用の妥当性

陰溶媒モデルを用いたシミュレーション系の時間発展を計算する為には、ランジュバン動力学法を用いる事が適切であると考えられる。ブラウン動力学法は、このランジュバン動力学法において、粒子の慣性運動が粒子と溶媒の間の摩擦力によって非常に短い時間に緩和されると考えた場合の極限に相当する。つまり、ブラウン動力学法では、粒子の慣性運動の効果は無視される。このような近似は、どのようなときに成り立つであろうか。

時間発展の計算の時間刻み幅を Δt とし、粒子と溶媒の間の摩擦力によって、時刻 t での粒子の慣性運動が時刻 $t + \Delta t$ において十分に緩和される為に必要な条件を考える。この条件が満たされるならば、慣性運動を無視する事は正当化されるだろう。そして、十分大きな Δt を用いれば条件は満たされるはずである。そのような Δt の下限を τ_{lower} とする。

本研究では、シミュレーションは $(\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}) = (0.00089 \text{ Pa} \cdot \text{s}, 10 \text{ fs}, 1.0 \text{ mm/s})$ の条件下で実行された。この条件では $\Delta t < \tau_{\text{lower}}$ となるから、ブラウン動力学法の使用は適切であるとは言えない。しかし、スケール変換を行った場合の条件、 $(\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}) = (2 \times 0.00089 \text{ Pa} \cdot \text{s}, 2 \times 10 \text{ fs}, 1.0/2 \text{ mm/s})$ では、 $\tau_{\text{lower}} < \Delta t$ となり、ブラウン動力学法の使用は適切であると言える (S9-3-3)。

さらに、筆者は S9-3-3, S9-3-4, S9-3-5, S9-3-6 において、 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ の条件においてブラウン動力学法の使用が適切であり、なおかつ、シミュレーションが適切に行なえるならば、 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ の条件に置いてもそうである事を示した。さらに、S9-3-7 において実際の脂質膜の粘性率について考察し、本研究のシミュレーション結果は、スケール変換を通して、実験結果と直接比較できると考えた。

S9-3-2 τ_{lower} の概算の手順

筆者は、粒子の慣性運動の緩和時間の目安を、並進運動と回転運動の二種類の場合について調べた。

まず、並進運動について記述する。粘性率 η の溶媒中に、流体力学的半径 a 、質量 m のペプチド結合粒子が単独で存在し、時刻 $t = 0$ において速度 $\mathbf{v} = \mathbf{v}_0$ で並進運動している状況を考える。粒子には、粒子と溶媒との間の摩擦力によって起こる粘性抵抗力 $\mathbf{F} = -6\pi a \eta \mathbf{v}$ のみが作用しているとする。粒子の流体力学的形状は球であるから、運動方向の依存性は無い。この場合、粒子の速度は指数関数的に減少し、 $\mathbf{v} = \mathbf{v}_0 \exp(-t/\tau^{\text{T}})$ と表される。ここで、 $\tau^{\text{T}} = m/(6\pi a \eta)$ は粒子の並進運動における慣性運動の特徴的な緩和時間を表す。

次に、回転運動について記述する。溶媒中にペプチド

結合粒子が単独で存在し、時刻 $t = 0$ において角速度 $\omega = \omega_0$ で回転運動している状況を考える。粒子には、粘性抵抗によるトルク $\mathbf{T} = -8\pi a^3 \eta \omega$ のみが作用しているとする。この場合、粒子の角速度は指数関数的に減少し、 $\omega = \omega_0 \exp(-t/\tau^{\text{R}})$ と表される。ここで、 $\tau^{\text{R}} = I/(8\pi a^3 \eta)$ は、粒子の回転運動における慣性運動の特徴的な緩和時間を表す。 $I = (2/5)ma^2$ は、粒子の質量 m が半径 a の球の内部に一様に分布していると想定した場合の、粒子の慣性モーメントである。

以上の結果から、 $\tau^{\text{T}} = m/(6\pi a \eta)$ に対し、 $\tau^{\text{R}} = m/(20\pi a \eta)$ であるから、常に $\tau^{\text{R}} < \tau^{\text{T}}$ である。それ故、 $\tau_{\text{lower}} = \tau^{\text{T}}$ となる。

具体的な τ_{lower} の算出の為には a 及び m の値が必要となる。本研究では、 a の値を、VDW モデルで表現したペプチド結合粒子に含まれる分子断片の形状を内包できるような一つの球の最小半径と、それを取り巻く水分子の半径から概算し、 $a = 0.4 \text{ nm}$ を用いる。また、ペプチド結合粒子に含まれる原子の質量の総和 (55Da) として、 $m = 9.13 \times 10^{-26} \text{ kg}$ を用いる。すると、本研究のシミュレーションに用いた条件 $(\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}) = (0.00089 \text{ Pa} \cdot \text{s}, 10 \text{ fs}, 1.0 \text{ mm/s})$ において $\tau_{\text{lower}} = 13.6 \text{ fs} > 10 \text{ fs} = \Delta t$ となる。しかし、条件 $(\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}) = (2 \times 0.00089 \text{ Pa} \cdot \text{s}, 2 \times 10 \text{ fs}, 1.0/2 \text{ mm/s})$ においては、 $\tau_{\text{lower}} = 6.8 \text{ fs} < 20 \text{ fs} = \Delta t$ となり、この時ブラウン動力学法の使用は適切であると言える。

S9-3-3 スケールの変換の妥当性の検証手順

条件 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ 下でのシミュレーション結果を、式 (206) 及び式 (207) を満たす条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ 下でのシミュレーション結果と見なす事ができると言う事は、数値計算上は正しい。そこで我々は、さらに、そのような条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ が、ブラウン動力学法を用いたシミュレーションに適する条件であるかどうかを、以下において調べた。

とあるシミュレーション条件 $(\Delta t, \eta, v^{\text{cl}})$ が、本研究において適切なシミュレーション条件となるためには以下の条件を満たす必要がある。(i) $\tau_{\text{lower}} < \tau_{\text{upper}}$ が満足される事。(ii) $\tau_{\text{lower}} < \Delta t < \tau_{\text{upper}}$ なる Δt を用いて安定なシミュレーションが計算できる事。ここで、 τ_{lower} 及び τ_{upper} は、S9-3-2 及び S5-1-1 に説明したものである。シミュレーション条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ が条件 (i) を満たす事は、S9-3-4 に示し、さらに条件 (ii) を満たす事は、S9-3-5 に示した。

さらに、S9-3-6 において、条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ を用いて膜タンパク質の引き抜きを行っても、ポリペプチド鎖に働く粘性力が十分小さく、また、ポリペプチド鎖の緩和時間も十分に短い事を示した。その結果として、少なく

とも $\eta_1 \leq \eta_2$ であるならば、適切な条件となる事が分かった。

S9-3-4 条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ の妥当性の評価その 1

$(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ の条件において $\tau_{\text{lower}} < \tau_{\text{upper}}$ が満たされていると仮定する。この時、 $\eta_1 \leq \eta_2$ である限りにおいては、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ 、及び、 $v_1^{\text{cl}} \cdot \Delta t_1 = v_2^{\text{cl}} \cdot \Delta t_2$ を満たす $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ において $\tau_{\text{lower}} < \tau_{\text{upper}}$ が満たされる事を以下に示す。

$\tau_{\text{lower}} < \tau_{\text{upper}}$ は次式で表される。

$$\frac{m}{6\pi a \eta} < \left(\frac{3 - \sqrt{5}}{2} \right) \frac{6\pi \eta a}{k^b} \quad (211)$$

この式は、次のように変形できる。

$$\left(\frac{2}{3 - \sqrt{5}} \right) \frac{mk^b}{(6\pi a)^2} < \eta^2 \quad (212)$$

この式は、 $\eta = \eta_1$ において成り立つのであるから、 $\eta_1 \leq \eta_2$ なる $\eta = \eta_2$ においても成り立つのは自明である。

S9-3-5 条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ の妥当性の評価その 2

$(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ の条件において $\tau_{\text{lower}} < \Delta t < \tau_{\text{upper}}$ が満たされていると仮定する。この時、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ 、及び、 $v_1^{\text{cl}} \cdot \Delta t_1 = v_2^{\text{cl}} \cdot \Delta t_2$ を満たす $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ においても $\tau_{\text{lower}} < \Delta t < \tau_{\text{upper}}$ が満たされる。この事を、 $\tau_{\text{lower}} < \Delta t$ と、 $\Delta t < \tau_{\text{upper}}$ の条件に分け、以下に示す。

$\tau_{\text{lower}} < \Delta t$ は、次式で表される。

$$\frac{m}{6\pi a} \leq \eta \Delta t \quad (213)$$

ここで、

$$\frac{\Delta t_1}{\eta_1} = \frac{\Delta t_2}{\eta_2} \quad (214)$$

であり、なおかつ $\eta_1 \leq \eta_2$ であるとすれば、 $1 \leq p$ 成る実数 p を用いて、

$$\Delta t_2 = p \Delta t_1, \quad (215)$$

及び、

$$\eta_2 = p \eta_1, \quad (216)$$

とかける。これらを使って、

$$\frac{m}{6\pi a} \leq \eta_1 \Delta t_1 \leq p^2 \eta_1 \Delta t_1 = \eta_2 \Delta t_2 \quad (217)$$

とかく事ができる。以上の事から、 $\tau_{\text{lower}} < \Delta t$ の条件が満たされる事が示された。

次に、 $\Delta t < \tau_{\text{upper}}$ の条件について調べる。この条件は次のように記述できる。

$$\frac{\Delta t}{\eta} < \left(\frac{3 - \sqrt{5}}{2} \right) \frac{6\pi a}{k^b} \quad (218)$$

この式は、 $\eta = \eta_1, \Delta t = \Delta t_1$ において成り立っているのだから、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ を満たす $\eta = \eta_2, \Delta t = \Delta t_1$ によっても当然満たされる。

以上の事から、 $\tau_{\text{lower}} < \Delta t_2 < \tau_{\text{upper}}$ が満たされる事が示された。

S9-3-6 条件 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ の妥当性の評価その 3

$(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ の条件において v_1^{cl} が適切な引き抜き速度となっていると仮定する。この時、 $\Delta t_1/\eta_1 = \Delta t_2/\eta_2$ 、及び、 $v_1^{\text{cl}} \cdot \Delta t_1 = v_2^{\text{cl}} \cdot \Delta t_2$ を満たす $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ において、 v_2^{cl} が適切な引き抜き速度となる。なぜなら、 $(\Delta t_1, \eta_1, v_1^{\text{cl}})$ の条件におけるシミュレーション結果と、 $(\Delta t_2, \eta_2, v_2^{\text{cl}})$ の条件に置けるシミュレーション結果は同等だからである。本研究では S7 において、 $(\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}) = (0.00089 \text{Pa} \cdot \text{s}, 10 \text{fs}, 1.0 \text{mm/s})$ の条件下では、架橋ポリペプチド鎖に働く粘性抵抗力が十分に小さく、 $v^{\text{cl}} = 1.0 \text{mm/s}$ が適切な引き抜き速度である事が示されている。

S9-3-7 実験条件に対応するシミュレーション条件

シミュレーション結果の相似性を考慮すると、 $(\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}) = (0.00089 \text{Pa} \cdot \text{s}, 10 \text{fs}, 1.0 \text{mm/s})$ の条件下で計算された本研究のシミュレーション結果を、 $(\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}) = (0.89 \text{Pa} \cdot \text{s}, 10 \text{ps}, 1000 \text{nm/s})$ の条件下で計算されたシミュレーション結果と同一視してよいと考えられる。ここで、条件 $(0.89 \text{Pa} \cdot \text{s}, 10 \text{ps}, 1000 \text{nm/s})$ は、以下で説明するように、実験を直接的に再現するようなシミュレーション条件である。それ故、本研究のシミュレーション結果を実験結果と直接的に比較する事は、妥当である。

バクテリオロドプシンを紫膜から強制的に引き抜きアンフォールディングさせる実験においては、膜タンパク質の部分的崩壊は、紫膜中で起こると考えられる。それ故、実験のシミュレーションをブラウン動力学法を用いて行う為には、溶媒環境の粘性率として、紫膜の粘性率を用いる事がふさわしいと考えられる。筆者は以下の手順で、紫膜の粘性率を見積もった。Winchil 等は、脂質膜内での DMPC 分子の拡散係数を測定する事によって、DMPC 脂質二重膜の粘性率を、25°C において概ね水の 100 倍であると算出している [71]。更に Winchil 等は、脂質膜中の膜タンパク質の割合が大きくなると脂質の拡散係数は低下すると報告している。そして、bR が稠密に詰まった構造をしている紫膜においては、脂質分子の拡散係数は脂質分子のみからなる脂質膜と比較して 10 分の 1 程度に低下する事を報告している [72]。これらの結果

から、紫膜中の粘性率は、水の粘性率 ($0.00089\text{Pa}\cdot\text{s}$) の約 $100\times 10=1000$ 倍、即ち $0.89\text{Pa}\cdot\text{s}$ であると見積もることができる。それ故、実験結果を再現するシミュレーションの条件としては、 $\eta = 0.89\text{Pa}\cdot\text{s}$ を用いる事がふさわしいと考えられる。

実験で用いられる引き抜き速度は、Sapra 等の実験 [20] において 700nm/s 、Kessler 等の実験 [21] において 1400nm/s 、そして、Voitchovsky 等の実験 [31] において 100nm/s である。Janovjak 等は、引き抜き速度を変化させた場合の強制アンフォールディング実験の結果を比較している [12]。この結果を見ると、引き抜き速度が 87nm/s と 1320nm/s の間で、力のピークの大きさがいくらか異なる事を除き、F-D 曲線に大きな違いはなさそうである。即ち、実験結果を再現するシミュレーションの条件として、 $v^{\text{cl}} = 1000\text{nm/s}$ を用いる事は、妥当であると考えられる。

条件 ($\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}$) = ($0.00089\text{Pa}\cdot\text{s}, 10\text{fs}, 1.0\text{mm/s}$) は、ブラウン動力学法を用いたシミュレーションを行う上で妥当である事は既に示した。そして、 $0.00089\text{Pa}\cdot\text{s} < 0.89\text{Pa}\cdot\text{s}$ であるから、($\eta, \Delta t, v^{\text{cl}}$) = ($0.89\text{Pa}\cdot\text{s}, 10\text{ps}, 1000\text{nm/s}$) もまた、物理的に妥当であると言う条件を満たしている。以上の事から、条件 ($0.89\text{Pa}\cdot\text{s}, 10\text{ps}, 1000\text{nm/s}$) は、実験を直接的に再現するようなシミュレーション条件であると考えられる。

紫膜中の脂質の拡散係数を紫膜の粘性率と見なす事は、非常に問題が大きいと筆者は認識している。そもそも、BR と脂質の混合物である紫膜に、単一の粘性率を割り当てる事自体に問題が含まれている。おそらく、上記で算出した紫膜の粘性率の値は、膜貫通ヘリックスの側鎖や脂質のアシル鎖が、紫膜中で感じる摩擦力のようなものを表現しているのだろう。既に、膜貫通ヘリックスが持つエネルギー地形の表面の凸凹の大きさが測定されている [51]。今後、ブラウン動力学法に用いる膜中の粘性率の値と、脂質膜中で膜貫通ヘリックスに働く摩擦力の値との間の関係を調べる必要がある。

S10 F-D 曲線の代表例

本研究では、バクテリオロドプシン (BR) の強制アンフォールディングシミュレーションを行った。具体的には、BR を C 末端側から及び N 末端側から引き抜くシミュレーションをそれぞれ 128 回行い、それぞれ 128 本の F-D 曲線を得た。図 S10-1 には、C 末端側からの引き抜きで算出された 128 本の F-D 曲線のうち、6 本を図示した。図 S10-2 には、同様に、N 末端側の 128 本の F-D 曲線のうち、6 本を図示した。F-D 曲線に出現した力の

ピークは、その位置に関して、C 末端側からの引き抜きにおいては 13 個の集団に、また、N 末端側では 18 個の集団に分けられた。図示された 6 本の F-D 曲線は、各集団に含まれる力のピークの内少なくとも一つ以上が 6 本の F-D 曲線のどれかに出現しているように選び出した。

一つのシミュレーション結果の F-D 曲線のデータは、10000 点の力と距離の情報から構成されている。両図中では、10000 点のデータを 10 点ごとに平均を取って 1000 点のデータに減らし、このデータを使用して F-D 曲線を描画した。

S11 力のピークの分類

本研究では、バクテリオロドプシン (BR) の強制アンフォールディングシミュレーションを行った。具体的には、C 末端側から BR を引き抜くシミュレーション、及び、N 末端側から BR を引き抜くシミュレーションを、それぞれ 128 回ずつ行った。そして、C 末端側及び N 末端側のそれぞれにおいて 128 本の F-D 曲線を得た。C 末端側で計算した F-D 曲線と、N 末端側で計算した F-D 曲線は、それぞれ独立に解析した。筆者は、F-D 曲線に出現した力のピークを、目視により探した。そして、C 末端側において合計で 918 個、また、N 末端側において合計で 1420 個の力のピークを見つけ出した。

力のピークは、以下の三種の情報 (以下ではピーク情報と呼ぶ) によって特徴づけられる。一つ目は、力の最大値 (以下、ピークの大きさと呼ぶ) である。二つ目は、力が最大となったときにおける膜表面とカンチレバーの間の距離である。三つ目は、力のピークが出現したときにおける架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基長 (以下、ピーク位置と呼ぶ) である。筆者は、全ての力のピークのピーク情報を調べた。C 末端側及び N 末端側のどちらの場合においても、ピーク位置は幾つかの特定の場所に集まっているように見えた。

本研究では、シミュレーションにおいて出現した力のピークの位置を、先行研究における他者の実験結果の力のピーク位置と比較する事が、重要な要素となる。適切な比較を行う為には、先ず最初に、力のピークが集団を形成している様子を調べ、さらに、各力のピークをそのピーク位置に関して複数の集団に分割する事が必要である。

筆者は、以下の手順によって、力のピークを複数の集団に分割した。最初に、全ての力のピークを、そのピーク位置の小さい順に並べ替えた。次に、並べ替えた後の順序を横軸に、また、そのピークのピーク位置を縦軸として、全ての力のピークをグラフ上にプロットした。こ

C-terminal side extraction

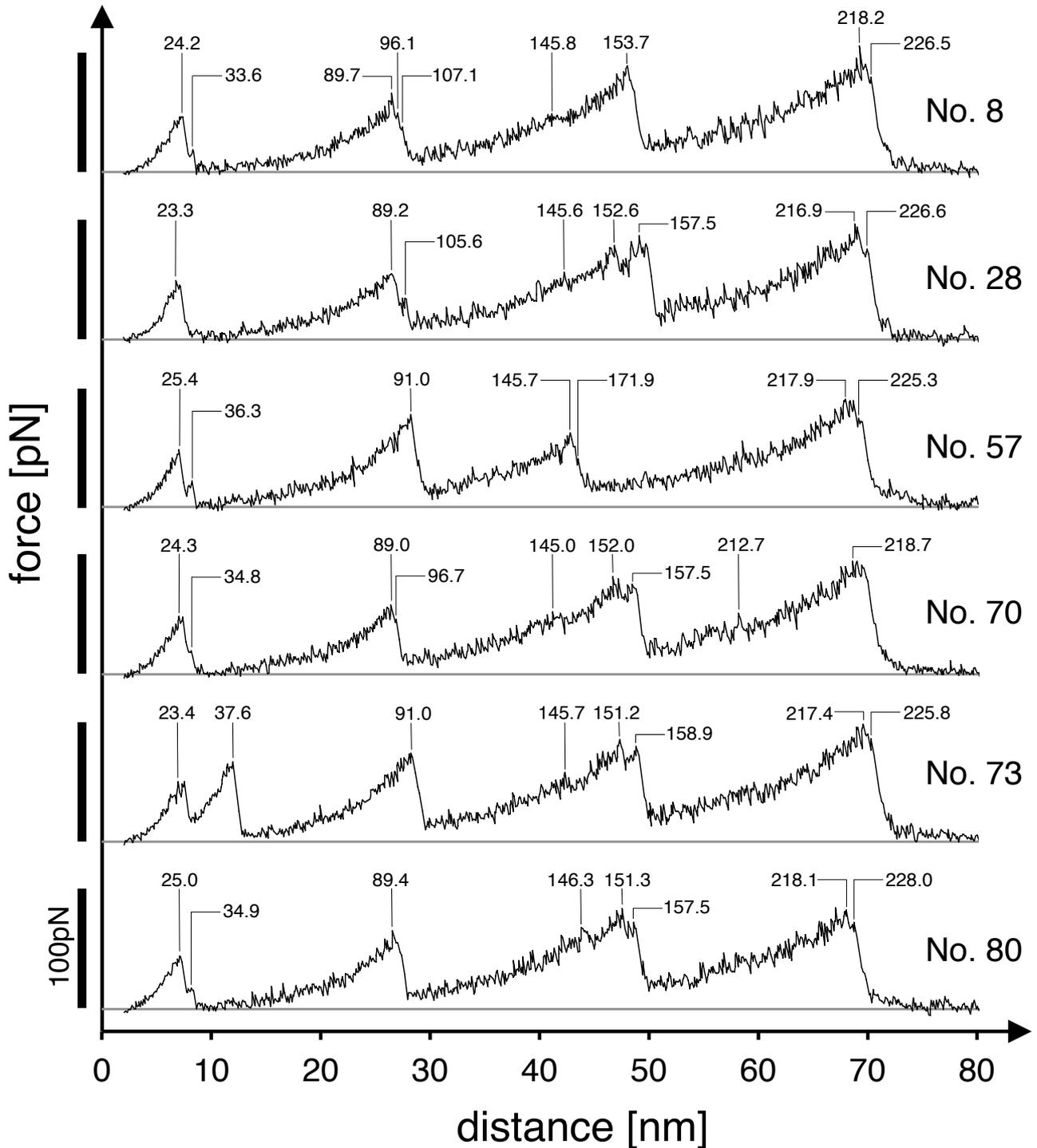


図 S 10-1: C 末端側から引き出した場合の、バクテリオロドプシンの強制アンフォールディングシミュレーションによって得られた F-D 曲線の 6 本の代表例。横軸はカンチレバーの針先と脂質膜表面間の距離を、縦軸は架橋ポリペプチド鎖の張力を示す。それぞれの F-D 曲線下部の灰色の横線は、それぞれの曲線における 0pN を表す。グラフ左側の黒棒の長さは 100pN の大きさを、グラフ右側の数字はシミュレーション番号を示す。F-D 曲線上に出現した各々の力のピークの上には、ピークが出現した時における架橋ポリペプチド鎖の長さ (アミノ酸残基数) を示した。

N-terminal side extraction

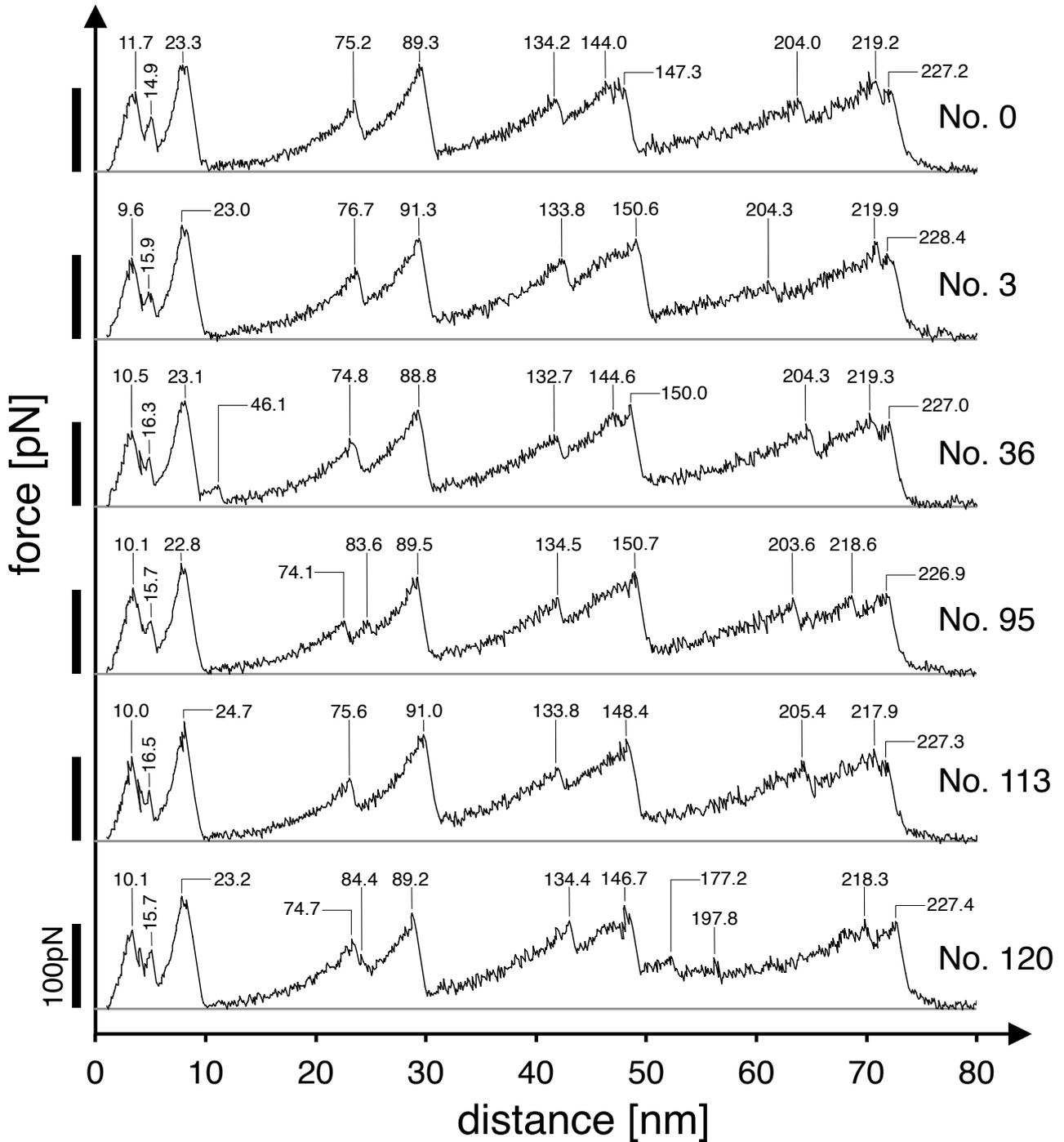


図 S 10-2: N 末端側から引き出した場合の、バクテリオロドプシンの強制アンフォールディングシミュレーションによって得られた F-D 曲線の 6 本の代表例。横軸はカンチレバーの針先と脂質膜表面間の距離を、縦軸は架橋ポリペプチド鎖の張力を示す。それぞれの F-D 曲線下部の灰色の横線は、それぞれの曲線における 0pN を表す。グラフ左側の黒棒の長さは 100pN の大きさを、グラフ右側の数字はシミュレーション番号を示す。F-D 曲線に出現した各々の力のピークの上には、ピークが出現した時における架橋ポリペプチド鎖の長さ（アミノ酸残基数）を示した。

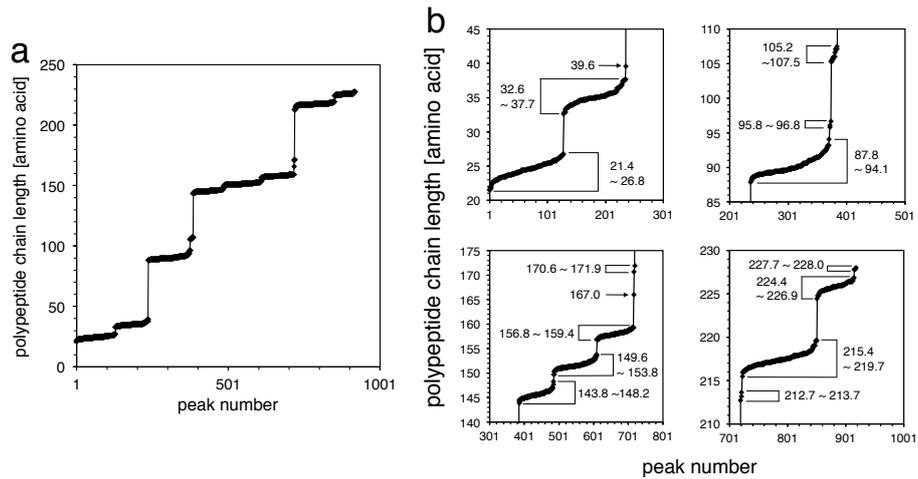


図 S 11-1: (a) C 端側からの引き抜きにおける、力のピーク位置の分布。横軸は、力のピーク位置の昇順に力のピークを並べた場合における力のピークの番号。縦軸は力のピークの位置。(b) 図 (a) の拡大図。力のピークはその位置に関して 13 のグループに分けられた。各グループの力のピーク位置の最小値 ~ 最大値は、点の集団の右または左側に記述した。39.6aa 及び 167.0aa の力のピークは、何れのグループへも所属しているように見えなかったため、解析からは取り除いた。

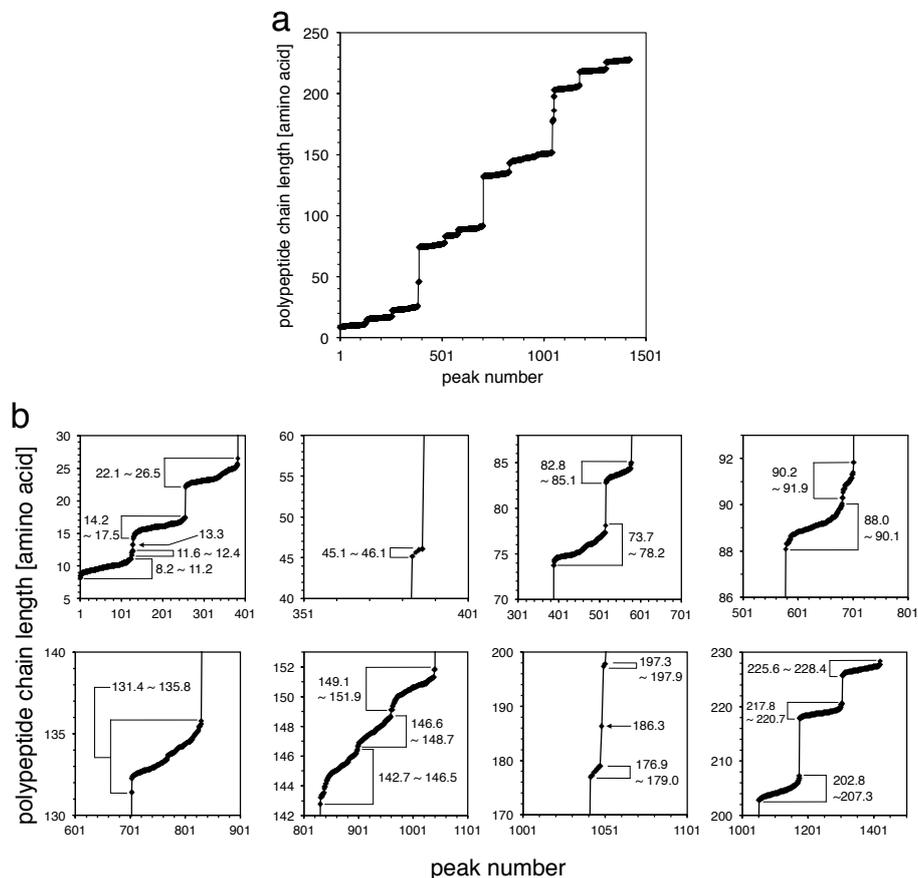


図 S 11-2: (a) N 端側からの引き抜きにおける、力のピーク位置の分布。横軸は、力のピーク位置の昇順に力のピークを並べた場合における力のピークの番号。縦軸は力のピークの位置。(b) 図 (a) の拡大図。力のピークはその位置に関して 18 のグループに分けられた。各グループの力のピーク位置の最小値 ~ 最大値は、点の集団の右または左側に記述した。13.3aa 及び 186.3aa の力のピークは、何れのグループへも所属しているように見えなかったため、解析からは取り除いた。

これらの結果は、C 末端側の場合について図 S11-1 に、N 末端側の場合について図 S11-2 に示した。

図 S11-1 及び図 S11-2 より、C 末端側及び N 末端側のどちらの場合においても、力のピークがそのピーク位

置に基づいて複数の集団に分かれている事が分かる。筆者は、ピーク位置の分布の範囲を考慮した上で、C 末端側の力のピークを 13 個の集団に、N 末端側の力のピークを 18 個の集団に分割した。ただし、集団に所属する

と見なせないような、単独で存在するピーク (C 末端側の 39.6aa, 167.0aa、及び、N 端側の 13.3aa, 186.3aa) は、集団に含めなかった。分割された集団内に含まれる力のピークのピーク位置の最小値～最大値は、グラフ中の点の集団の左右に示した。

S12 ピーク情報の統計

本研究では、バクテリオロドプシン (BR) の強制アンフォールディングシミュレーションを行った。そして、C 末端側から BR を引き抜いた場合、及び、N 末端側から BR を引き抜いた場合のそれぞれにおいて、128 本の F-D 曲線が得られた。C 末端側で計算した F-D 曲線と、N 末端側で計算した F-D 曲線は、それぞれ独立に解析した。筆者は、F-D 曲線に出現した力のピークを、目視により探した。そして、C 末端側において合計で 918 個、また、N 末端側において合計で 1420 個の力のピークを見つけ出した。さらに、C 末端側の力のピークを 13 個の集団に、また、N 末端側の力のピークを 18 個の集団に分割した。

力のピークは、以下の三種の情報 (以下ではピーク情報と呼ぶ) によって特徴づけられる。一つ目は、力の最大値 F_{\max} (以下、ピークの大きさと呼ぶ) である。二つ目は、力が最大となったときにおける膜表面とカンチレバーの間の距離 D である。三つ目は、力のピークが出現したときにおける架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基長 L (以下、ピーク位置と呼ぶ) である。

筆者は、力のピークの統計的な情報を、各集団ごとに算出した。即ち、各集団ごとに、その集団に含まれる全ての力のピークの F_{\max} , D , 及び L の平均値 \pm 標準偏差を算出した。それらの値は、C 端側の場合について表 S12-1 に、また、N 端側の場合について表 S12-2 に示した。

S13 ポリペプチド鎖の長さの頻度分布

シミュレーション上のアンフォールディング過程に現れたエネルギー障壁及びその位置は、次の手法によっても調査した。その手法とは、全シミュレーション中での架橋ポリペプチド鎖の長さの頻度分布のピークを調べるといものである。筆者は、この手法を用いて、C 末端側のシミュレーション結果と N 末端側のシミュレーション結果をそれぞれ独立に解析した。

シミュレーション結果の番号を i (0~127) とし、シミュレーション結果中の各フレームの番号を j (0~9999) とする。 i 番目のシミュレーション結果の j 番目のフレームにおける架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸算基長を、 $L_{i,j}$

とする。 $L_{i,j}$ の集合を、 $\{L_{i,j}\}$ とする。ただし、ポリペプチド鎖が膜から完全に抽出されている場合は、 $L_{i,j}$ を算出せず、集合にも含めない。 k を 0~247 の整数とし、 $k - 0.5 \leq L_{i,j} < k + 0.5$ を満たす $\{L_{i,j}\}$ の要素数を、階級値 k に属する架橋ポリペプチド鎖の長さの頻度 $\tilde{F}(k)$ とする。最大値が 1 となるように $\tilde{F}(k)$ を規格化したものを、相対頻度 $F(k)$ とする。

架橋ポリペプチド鎖の長さの相対頻度分布に現れた頻度のピークは、以下の手順で取り出した。まず、以下の二つの基準を満たす k の集合 $\{k'_p\}$ を求め、これを頻度の仮のピーク位置とする。

$$F(k-2), F(k-1), F(k+1), F(k+2) < F(k) \quad (219)$$

$$0.0003 < F(k) \quad (220)$$

ここで、式 (219) の基準は $F(k)$ が頻度のピークである事を限定する。また、式 (220) の基準は小さすぎるピークを排除する為に設定された。

頻度分布のピークは、数残基程度の幅を持つ。そこで $\{k'_p\}$ の各要素 k'_p から、次の式を用いて、最終的なピーク位置 k_p を求めた。

$$k_p = \sum_{i=k'_p-2}^{k'_p+2} F(i) \cdot i \bigg/ \sum_{i=k'_p-2}^{k'_p+2} F(i) \quad (221)$$

このようにして求められたピーク位置 k_p を、エネルギー障壁位置と見なした。解析の結果は、C 末端側の場合について図 S13-1(a) に、N 末端側の場合について S13-1(b) に示した。

S14 エネルギー障壁位置の換算法

S14-1 ピーク位置の比較の絶対的基準

本研究では、バクテリオロドプシン (BR) の強制アンフォールディング実験の計算機シミュレーションを行った。

シミュレーションによって得られた力のピーク位置を、他研究者が実験によって計測したピーク位置と比較する事は、本研究のシミュレーションが適切に実験を再現できているかどうかを評価する為に重要である。

力のピーク位置の定義や考え方には、論文によって違いがある。そのため、力のピーク位置の比較を行う為には、以下の二つの事が必要である。一つ目は、力のピーク位置を評価する為の基準 (以下では絶対的基準と呼ぶ) を決定する事である。二つ目は、筆者の結果や他者の論

表 S 12-3: C 端側の引き抜きの場合において現れた 13 個のピーク情報の集団に関する統計情報

Region of length [aa]	Length [aa]	Force [pN]	Distance [nm]	Number of incidence
21.4 ~ 26.8	24.4 ± 1.1	50.2 ± 4.8	7.0 ± 0.3	128
32.6 ~ 37.7	35.0 ± 1.0	25.3 ± 7.6	8.4 ± 0.6	107
87.8 ~ 94.1	90.2 ± 1.2	68.8 ± 6.8	27.0 ± 0.6	128
95.8 ~ 96.8	96.2 ± 0.5	53.1 ± 3.7	27.2 ± 0.4	3
105.2 ~ 107.5	106.3 ± 0.8	37.9 ± 4.7	27.6 ± 0.6	11
143.8 ~ 148.2	145.6 ± 0.7	68.1 ± 7.6	43.0 ± 1.1	100
149.6 ~ 153.8	151.6 ± 0.7	87.7 ± 8.8	47.1 ± 0.9	125
156.8 ~ 159.4	158.0 ± 0.6	82.6 ± 8.1	48.8 ± 0.7	106
170.6 ~ 171.9	171.3 ± 0.9	46.7 ± 5.2	46.4 ± 4.1	2
212.7 ~ 213.7	213.2 ± 0.5	50.1 ± 4.2	57.0 ± 1.6	3
215.4 ~ 219.7	217.4 ± 0.8	95.6 ± 7.9	68.3 ± 0.9	128
224.4 ~ 226.9	225.8 ± 0.5	83.1 ± 6.2	69.6 ± 0.7	64
227.7 ~ 228.0	227.9 ± 0.1	76.2 ± 5.0	69.2 ± 1.1	3

”Region of length” 列は、各集団内での力のピーク位置の最小値～最大値を示す。”Length”, “Force”, 及び, “Distance” の各列は、それぞれ、集団内での力のピーク位置、力のピークの大きさ、及び、膜表面-カンチレバー間距離の平均値 ± 標準偏差である。”Number of incidence” 列は、集団内に含まれる力のピークの数を示す。

表 S 12-4: N 端側の引き抜きの場合において現れた 18 個のピーク情報の集団に関する統計情報

Region of length [aa]	Length [aa]	Force [pN]	Distance [nm]	Number of incidence
8.2 ~ 11.2	9.8 ± 0.6	96.5 ± 5.5	3.3 ± 0.1	124
11.6 ~ 12.4	12.1 ± 0.3	96.9 ± 4.8	3.4 ± 0.1	4
14.2 ~ 17.5	16.1 ± 0.6	64.1 ± 8.1	4.9 ± 0.2	126
22.1 ~ 26.5	23.6 ± 0.9	132.9 ± 4.7	8.0 ± 0.2	128
45.1 ~ 46.1	45.7 ± 0.4	24.4 ± 3.2	10.7 ± 0.7	4
73.7 ~ 78.2	75.5 ± 0.9	74.1 ± 8.3	22.9 ± 0.6	128
82.8 ~ 85.1	83.7 ± 0.4	59.5 ± 6.8	24.3 ± 0.5	63
88.0 ~ 90.1	89.1 ± 0.4	113.8 ± 10.5	29.0 ± 0.5	103
90.2 ~ 91.9	91.0 ± 0.3	120.5 ± 7.5	29.4 ± 0.3	21
131.4 ~ 135.8	133.6 ± 0.9	95.1 ± 6.8	42.1 ± 0.5	128
142.7 ~ 146.5	145.1 ± 0.8	115.1 ± 5.7	47.2 ± 0.6	67
146.6 ~ 148.7	147.7 ± 0.5	116.8 ± 5.3	47.8 ± 0.5	60
149.1 ~ 151.9	150.5 ± 0.6	115.3 ± 6.2	48.7 ± 0.4	80
176.9 ~ 179.0	178.0 ± 0.8	67.9 ± 6.7	52.4 ± 1.2	7
197.3 ~ 197.9	197.6 ± 0.4	55.4 ± 7.6	55.1 ± 1.5	2
202.8 ~ 207.3	204.4 ± 0.9	85.6 ± 10.5	62.9 ± 1.4	122
217.8 ~ 220.7	218.8 ± 0.6	108.4 ± 7.6	70.1 ± 0.8	128
225.6 ~ 228.4	226.8 ± 0.5	99.4 ± 7.8	71.9 ± 0.8	115

”Region of length” 列は、各集団内での力のピーク位置の最小値～最大値を示す。”Length”, “Force”, 及び, “Distance” の各列は、それぞれ、集団内での力のピーク位置、力のピークの大きさ、及び、膜表面-カンチレバー間距離の平均値 ± 標準偏差である。”Number of incidence” 列は、集団内に含まれる力のピークの数を示す。

文の力のピーク位置を、絶対的基準に基づく力のピーク位置 (以下では絶対位置と呼ぶ) に換算する事である。本研究では、絶対的基準を以下の基準 A とした。

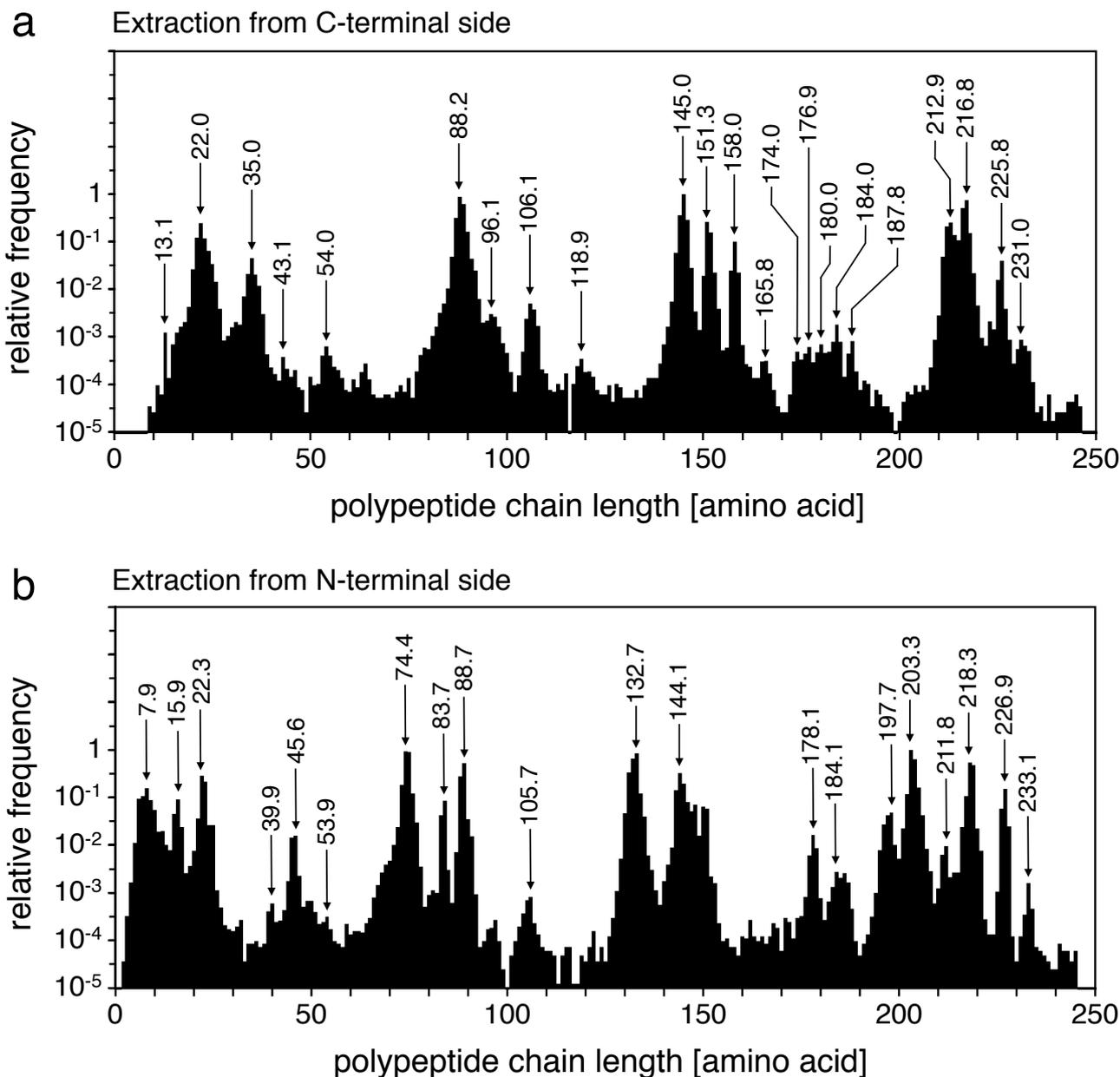


図 S13-1: (a)C 末端側から引き抜いた場合における、シミュレーション全体を通して観察された架橋ポリペプチド鎖の長さ (横軸) と、その長さの相対出現頻度 (縦軸、対数表示)。グラフ中の横軸は、架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基長であり、縦軸は、全シミュレーションを通して調べた架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基長の相対出現頻度 (対数表示) である。グラフ中の相対出現頻度のピークの上には、その前後の残基を含めた平均位置 (つまり k_p) を示した。13.1 のピークは、初期構造に依存して出現したものであった為、以降、障壁位置とは見なさない。(b)N 末端側から引き抜いた場合における、シミュレーション全体を通して観察された架橋ポリペプチド鎖の長さ (横軸) と、その長さの相対出現頻度 (縦軸、対数表示)。グラフ中の横軸は、架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基長であり、縦軸は、全シミュレーションを通して調べた架橋ポリペプチド鎖のアミノ酸残基長の相対出現頻度 (対数表示) である。グラフ中の相対出現頻度のピークの上には、その前後の残基を含めた平均位置 (つまり k_p) を示した。

基準 A

力のピーク位置は、力のピークが出現した時点における、カンチレバーに付着した部分を含み、且つ、脂質膜表面よりもカンチレバー側にあるポリペプチド鎖のペプチド結合の数で表す。

筆者はこの絶対的基準の基づき、本研究のシミュレーションにおける力のピーク位置及び他研究者 (Sapra et al.[20], Kessler et al.[21], Voitchovsky et al.[31]) の実験的

報告における力のピーク位置を、絶対位置に換算した。換算方法は、S14-2, S14-3, S14-4, S14-5 に記述した。また、換算結果は、C 末端側からの引き抜きの場合について表 S14-1 に、N 末端側からの引き抜きの場合について表 S14-2 に示した。

本研究で採用した基準以外に、力のピーク位置を評価する基準として以下の基準 B が考えられる。

基準 B

力のピーク位置は、力のピークが出現した時点における、膜タンパク質のフォールドしている部分とアンフォールドした部分の境目に存在するアミノ酸残基の番号で表す。

この基準を採用する為には、以下の二つの事を仮定する必要がある。(i) 膜タンパク質のアンフォールドしていない部分は、天然構造を保ち続ける。(ii) 膜タンパク質は、カンチレバーで引っ張った末端ループから順にアンフォールドする。(i) 及び (ii) は概ね正しいと考えられる。しかし、本研究の結果から言うと、これらの想定は部分的に正しくないと考えられる。それ故、本研究では基準 B を絶対的基準として採用しなかった。

S14-2 本研究のシミュレーション結果

本研究のシミュレーション結果から算出されたピーク位置は、以下の手順によって絶対位置に換算した。本研究で使用したポリペプチド鎖は 247 残基であり、本来のバクテリオドブシン (248 残基) の C 末端ループの G²⁴¹ が欠失している。それ故、C 末端側からの引き抜きでは、シミュレーション結果から算出されたピーク位置に 1 を加えたものを絶対位置とした。N 末端側のシミュレーション結果から算出されたピーク位置は、そのまま

表 S 14-1: C 末端側からの引き抜きにおけるエネルギー障壁位置の換算前と換算後の値の対応

Kessler <i>et al.</i>		Voitchovsky <i>et al.</i>	
before conversion	after conversion	before conversion	after conversion
50	39.1	8	27
60	51.6	18	37
86	87.4	22	41
97	94.3	35	54
113	103.6	39	58
119	107.4	53	72
147	146.5	65	84
166	157.9	80	99
180	167.9	97	116
183	173.2	109	128
216	214.1	128	147
227	220.6	141	160
242	230.6	154	173
		169	188
		189	208
		212	231
		233	252

絶対位置とした。各々のエネルギー障壁の出現頻度は、S11 に記載したものをを用いた。

S14-3 Sapra 等の実験結果

Sapra 等は、天然 BR と 3 点変異体 BR を C 末端側から引き抜く強制アンフォールディング実験を行い、力のピークの出現頻度を両者の間で比較した [20]。この実験では、3 点変異体 BR の力のピーク位置は、天然 BR のそれと同じである事が示された。筆者は、彼らの論文の TABLE 1 の 'Peak position from C-terminus' に記載されたピーク位置を、そのまま C 末端側の力のピークの絶対位置として使用した。また、それらの力のピークの出現頻度は、彼らの論文の TABLE1 に記載された WT BR のものを使用した。この文献では、N 末端側からの引き抜きは行われていない。

S14-4 Kessler 等の実験結果

Kessler 等は、BR を C 末端側から及び N 末端側から引き抜く強制アンフォールディング実験を行った [21]。その論文では、力のピークの出現時における、脂質膜内部のアンカーポイントからカンチレバーに付着した末端ループの端までのポリペプチド鎖のアミノ酸残基長が記載されている。彼らはそれを 'contour length' と呼び、その値は、彼らの論文の Figure 2、並びに、Table S1 及び Table S2 に記載されている。アンカーポイントとは、膜

表 S 14-2: N 末端側からの引き抜きにおけるエネルギー障壁位置の換算前と換算後の値の対応

Kessler <i>et al.</i>		Voitchovsky <i>et al.</i>	
before conversion	after conversion	before conversion	after conversion
74	75.8	7	9
83	78.9	28	30
91	83.5	45	47
98	87.8	57	59
102	90.3	77	79
111	102.6	92	94
133	131.3	114	116
148	140.2	129	131
155	144.6	157	159
164	150.6	174	176
172	161.7	184	186
187	183.1	199	201
223	213.2	212	214
		225	227

タンパク質において、未だ天然構造を保持している部分と既にほどかれ引き延された状態となっている部分の境界の事を指す。彼らは、F-D 曲線の解析において以下の二点を想定し、アンカーポイントを特定した。(i) 膜タンパク質のアンフォールドしていない部分は、天然構造を保ち続ける。(ii) 膜タンパク質は、カンチレバーで引張った末端ループから順にアンフォールドする。

彼らの論文の 'contour length' の値は、次の方法によって絶対位置に換算出来る。それは、'contour length' の値から、アンカーポイントと紫膜表面の間に存在する引き延された状態にあるポリペプチド鎖のアミノ酸算残基長を差し引く事である。具体的には次式によって換算を実行した。

$$L = L_k - \frac{2.1\text{nm} - z}{0.36\text{nm}} \quad (222)$$

ここで、 L は、力のピークの絶対位置である。 L_k は、'contour length' の値である。2.1nm は紫膜表面の z 座標を表す。この値は筆者が想定した。0.36nm は引き延された状態にあるポリペプチド鎖の 1 残基あたりの長さを表す。 z は、アンカーポイントの z 座標を表す。この値は、彼らの論文の Figure 3 から、筆者が読み取った。C 端側の場合にはそのままの値を、N 端側の場合には符号を反転させた値を使用した。

換算前の 'contour length' の値と、換算後の力のピークの絶対位置は、C 末端側の場合については表 S14-1 に、N 末端側の場合については表 S14-2 に示した。彼らの論文の Table S1 及び Table S2 には、力のピークの出現頻度もまた記載されている。

S14-5 Voitchovsky 等の実験結果

Voitchovsky 等は、BR を C 末端側から及び N 末端側から引き抜く強制アンフォールディング実験を行い、溶液の塩濃度と力のピークの出現状況の関係を調べた [31]。彼らの論文の TABLE 2 の 'aa pos. of step' の列には、力のピークが出現したときにおける、紫膜表面とカンチレバーの針先の間を繋ぐポリペプチド鎖の長さが記述されている。この 'aa pos. of step' の値は、次の方法によって絶対位置に換算できる。それは、'aa pos. of step' の値に、針先に付着した部分からその末端ループの端までのポリペプチド鎖のアミノ酸算残基長を加えるという事である。

彼らは、C 末端側の引き抜きでは、230 または 228 番のアミノ酸残基がカンチレバーの針先に付着していると想定した。それ故、筆者は、その間を取って 229 番のアミノ酸が針先に付着していると想定した。そして、BR の全長である 248 残基から 229 残基を引く事によって

得られる 19 残基を C 端側の 'aa pos. of step' に加え、これを力のピークの絶対位置として使用した。また、彼らは、N 末端側の引き抜きでは、3 番のアミノ酸残基が針先に付着していると想定した。それ故、筆者は、3-1=2 残基を、N 端側の 'aa pos. of step' に加え、これを力のピークの絶対位置として使用した。換算前の 'aa pos. of step' の値と、換算後の力のピークの絶対位置は、C 末端側の場合については表 S14-1 に、N 末端側の場合については表 S14-2 に示した。

彼らの論文の FIGURE3 には力のピークの出現頻度がグラフに示してあるが、読み取るのが困難であるため本研究では使用しなかった。

S15 障壁位置の再現性の統計的検定

S15-1 概要

本文章では、シミュレーション結果において実験結果のエネルギー障壁の位置が再現された度合いが、偶然の結果とは考え難いほど高い事を示す。

本研究のシミュレーション結果から算出された障壁位置は、他者の実験において報告された障壁位置に良く一致しているように見える。しかしながら、その一致は偶然かも知れない。一致が単なる偶然の結果であるかどうかを評価する事は、本研究において非常に重要である。なぜなら、それによって、シミュレーションモデルに与えた相互作用が障壁の出現及び障壁位置の決定に関与しているかどうかと言う事が評価されるからである。

この障壁位置の再現が偶然である可能性は、簡潔に言えば、次のようにして評価する事ができる。それは、「シミュレーション結果の障壁位置と同数の位置を無作為に選び出し、それを実験の障壁位置と比較し、一致する障壁位置の数を調査する」という試行を何度も行う事である。もし、無作為な位置の選択によって作られた結果がシミュレーション結果よりも優れたものとなる確率が十分に小さいなら、シミュレーション結果における障壁位置の再現は偶然とは考えにくいと判断できる。

上記の考えに基づいて、筆者はこの偶然性を、統計学的仮説検定を用いて以下のように評価した。まず、以下の帰無仮説を立てた。

帰無仮説

シミュレーション結果の障壁位置と実験結果の障壁位置の間の一一致の程度は、無作為に作成した障壁位置と実験結果の障壁位置の間の一一致の程度と同じである。

そして以下の事を行った。

- (I) 二つの障壁位置データ間の一致の程度を、数量的に評価する基準を定める事 (S15-2 を見よ)。
- (II) シミュレーション結果の障壁位置と実験結果の障壁位置との間の一致の度合いを、(I) で決定した基準に基づいて数量的に評価する事 (S15-3 を見よ)。
- (III) 無作為な数値の選択によって作成した障壁位置と実験結果の障壁位置との間の一致の程度の確率分布を計算する事 (S15-4 を見よ)。
- (IV) 無作為に障壁位置を作成したとき、この障壁位置と実験結果の障壁位置との間の一致の程度が、シミュレーションと実験の間の障壁位置の一致の程度以上になる確率 p を計算する事 (S15-4 を見よ)。
- (V) 最終的に、このようにして算出された確率 p を用いて、帰無仮説が棄却されるかどうかを調べる事 (S15-5 を見よ)。

S15-2 障壁位置間の一致の度合いの評価基準

二つの障壁位置データ間の一致の程度を数量的に評価する基準を、以下の様に定義した。まず、二つの障壁位置データの間で比較を行う区間を $[\min, \max]$ とする。一方のデータについて、その区間内に含まれる障壁位置 y の集合 $\{y\}$ を考え、これを正答データとする。もう一方のデータについて、同区間に含まれる障壁位置 x の集合 $\{x\}$ を考え、これを疑問データとする。そして、以下の条件を満たす y の個数を n と定義する。

条件

とある正答データの障壁位置 y について、 $y-3 \leq x \leq y+3$ を満足する疑問データの障壁位置 x が存在する。

最終的に、この n を、区間 $[\min, \max]$ における、疑問データの正答データに対する「一致数」と呼ぶ。正答データ y に与えた範囲 $\pm 3\sigma$ は、実験における誤差の範囲 [21] を参考にして定めた。

S15-3 一致の程度の数量的な評価

筆者は、上記の評価法を用いて、シミュレーション結果の障壁位置(疑問データとして使用した)を実験結果の障壁位置(正答データとして使用した)と比較した。ここで、シミュレーション結果の障壁位置として、力のピーク位置のグループの解析によって得られた結果を使用した。また、実験結果の障壁位置としては、Sapra et al.[20], Kessler et al.[21], 及び、Voitchovsky et al.[31] の実験的報告において供給されたデータを筆者が換算する事によ

て算出した障壁位置(本文 Fig.6 及び S14 を見よ)を使用した。

C 末端側の全区間 $([0, 247])$ においては、シミュレーション結果の障壁位置の、Sapra, Kessler 及び、Voitchovsky の各実験結果の障壁位置に対する一致数は、それぞれ、 $n_{sim} = 8, 8$, 及び 7 であった。N 末端側の全区間 $([0, 247])$ においては、シミュレーション結果の障壁位置の、Kessler、及び Voitchovsky の各実験結果の障壁位置に対する一致数は、それぞれ、 $n_{sim} = 7$ 及び 6 であった。また、N 端側において、比較区間を $[70, 194]$ に制限したときの、シミュレーション結果の障壁位置の、Kessler の実験結果の障壁位置に対する一致数は、 $n_{sim} = 7$ であった。

S15-4 偶然による一致の度合いの分布

無作為に作成した障壁位置の、実験結果の障壁位置に対する一致数 n_{rand} が n となる確率の分布は、以下の手順で求めた。まず、比較区間 $[\min, \max]$ の中から、その区間に存在するシミュレーション結果の障壁位置の数 $([0, 247])$ の場合は C、N 末端の場合について 13 個、18 個、そして、 $[70, 194]$ の場合には N 末端の場合について 9 個) と同数の障壁位置を無作為に選び、これを疑問データとする。次に、この疑問データの、それぞれの正答データ(実験結果の障壁位置)に対する一致数 n_{rand} を調べる。このような試行を 10^{10} 回行ない、 n_{rand} が n となる確率の分布 $p(n_{rand} = n)$ を求める。

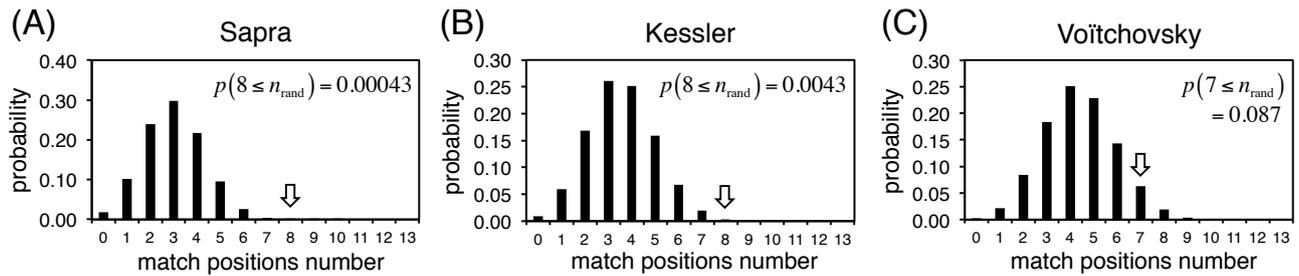
C 末端側からの引き抜きにおいて、筆者は、比較区間を $[0, 247]$ とし、Sapra, Kessler、及び、Voitchovsky の実験結果の障壁位置を用いた場合の確率分布を算出した。また、N 末端側からの引き抜きにおいては、比較区間を $[0, 247]$ とし、Kessler 及び、Voitchovsky の実験結果を用いた場合の確率分布を算出し、さらに、比較区間を $[70, 194]$ とし、Kessler の実験結果を用いた場合の確率分布を算出した。さらに筆者は、それぞれの確率分布において、 n_{rand} がシミュレーション結果の障壁位置の実験結果の障壁位置に対する一致数 n_{sim} 以上となる確率 $p(n_{sim} \leq n_{rand})$ を算出した。

以上で算出した n_{sim} , 確率分布, 及び $p(n_{sim} \leq n_{rand})$ の値は、図 S15-1 にまとめた。

S15-5 帰無仮説の評価

C 末端側の引き抜きでは、シミュレーション結果の障壁位置と Sapra の実験結果の障壁位置との比較において $p(n_{sim} \leq n_{rand}) = 0.00043$ が、また、Kessler の実験結果の障壁位置との比較において、 $p(n_{sim} \leq n_{rand}) = 0.0043$ という値が得られた。それ故、それら二つの場合におい

Extraction from C-terminal side



Extraction from N-terminal side

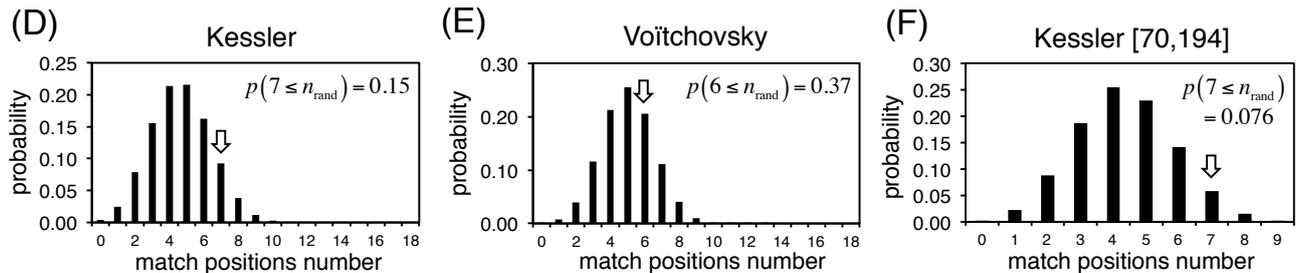


図 S 15-1: 柱状グラフによって表した、無作為な選択によって作成した障壁位置と、実験結果の障壁位置の一致の数 n_{rand} が n となるような確率の分布。C 末端側からの引き抜きにおいて、比較の範囲が $[0,247]$ であり、且つ、実験結果が Sapra 等のものである場合 (A)、Kessler 等のものである場合 (B)、及び、Voitchovsky 等のものである場合 (C)。N 末端側からの引き抜きにおいて、比較の範囲が $[0,247]$ であり、且つ、実験結果が Kessler 等のものである場合 (D)、及び、Voitchovsky 等のものである場合 (E)、また、比較の範囲が $[70,194]$ であり、且つ、実験結果が Kessler 等のものである場合 (F)。各図において、横軸は、一致の数を表し、縦軸は、その確率を表す。各図において、黒の柱は、 $n_{\text{rand}} = n$ となる確率を表す。白抜き矢印は、シミュレーション結果の実験結果に対する一致数 n_{sim} を表す。 $p(n_{\text{sim}} \leq n_{\text{rand}})$ は、 $n_{\text{sim}} \leq n_{\text{rand}}$ となる確率をあらわす。

ては、 $P = 0.01$ の水準で帰無仮説は棄却された。この結果は、上記二つの場合において、シミュレーションによって再現された実験結果の障壁位置の数が、偶然の結果とは考え難いほど多い事を示す。そして同時に、本研究で用いたシミュレーション系には、エネルギー障壁の形成に関するメカニズムが含まれている可能性が極めて高いという事を意味する。ただし、Voitchovsky の実験結果の障壁位置との比較では、 $p(n_{\text{sim}} \leq n_{\text{rand}}) = 0.087$ となり、帰無仮説は棄却されたとは言えなかった。

N 末端側からの引き抜きでは、比較区間が $[0,247]$ である場合、シミュレーション結果の障壁位置と Kessler の実験結果の障壁位置との比較において $p(n_{\text{sim}} \leq n_{\text{rand}}) = 0.15$ が、また、Voitchovsky の実験結果の障壁位置との比較において、 $p(n_{\text{sim}} \leq n_{\text{rand}}) = 0.37$ という値が得られた。それ故、それら二つの場合はにおいては、 $P = 0.01$ の水準で帰無仮説は棄却されたとは言えなかった。比較区間が $[70,194]$ である場合にも、Kessler の実験結果の障壁位置との比較において $p(n_{\text{sim}} \leq n_{\text{rand}}) = 0.076$ となり、やはり $P = 0.01$ の水準で帰無仮説は棄却されたとは言えなかった。結果として、N 末端側からの引き抜きでは、シミュレーションによって再現された実験結果の障壁位置の数は、偶然の結果である事を否定できなかった。しかしながら、念のために述べておくと、この結果は、N 末端側からの引き抜きでは障壁位置は再現されなかった

という事を意味しているのではない。

S16 力のピークの出現パターン

バクテリオロドプシンの強制アンフォールディングシミュレーションの結果から、強制アンフォールディング過程における力のピークの出現パターンを調べた。

C 末端側からの引き抜きで観察された強制アンフォールディング過程は、全てのシミュレーション結果において、ヘリックス GF, ED, CB, 及び A という四つの部分に分かれていた。それ故、力のピークの出現パターンは、この四つの部分的なアンフォールディング過程ごとに調査した。結果は、表 S16-1 に示した。

N 末端側からの引き抜きで観察された強制アンフォールディング過程は、大きく分けて以下の二つの事例が存在した。(i) アンフォールディング過程が、ヘリックス AB, CD, EF, 及び G という四つの部分に分かれている事例であり、121 の結果がこの事例に属した。(ii) ヘリックス E のアンフォールディングに先立ってヘリックス F 及び G、並びに、ループ FG が、自発的に基板側の膜外に引き抜ける現象が見出される事例であり、7つの結果がこの事例に属した。この事例では、アンフォールディング過程は、ヘリックス AB, CD, 及び EFG という三つの

表 S 16-1: C 端側からの強制アンフォールディングシミュレーションにおけるエネルギー障壁の出現パターン

Helices G & F and loop GF					Helices E & D and loop ED					Helices C & B and loop CB					Helix A and N-terminal loop						
24.4aa	35.0aa-A	35.0aa-B	Number		90.2aa	96.2aa	106.3aa	Number		145.6aa	151.6aa	158.0aa	171.3aa	Number		213.2aa	217.4aa	225.8aa	227.9aa	Number	
1	0	0	21		1	0	0	115		0	0	1	0	1		0	1	0	0	59	
1	1	0	104		1	1	0	2		1	0	0	1	1		0	1	0	1	3	
1	0	1	3		1	0	1	10		1	0	1	0	1		0	1	1	0	63	
					1	1	1	1		0	1	0	0	4		1	1	0	0	2	
										0	1	1	0	23		1	1	1	0	1	
										1	1	0	0	16							
										1	1	0	1	1							
										1	1	1	0	81							

一段目は、部分的なアンフォールディング過程を表す。エネルギー障壁名の列は、そのエネルギー障壁によって力のピークが出現したかどうかを、出現した場合には1で、そうでなかった場合には0で表す。'Number'列は、各行において1と0で表されている出現パターンが観察された数を示した。

表 S 16-2: N 端側からの強制アンフォールディングシミュレーションにおけるエネルギー障壁の出現パターン

Helices A & B and loop AB						Helices C & D and loop CD					Helices E & F and loop EF					Helix G and C-terminal loop				
9.8aa	12.1aa	16.1aa	23.6aa	45.7aa	Number	75.5aa	83.7aa	89.1aa	91.0aa	Number	133.6aa	145.1aa	147.7aa	150.5aa	Number	204.4aa	218.8aa	226.8aa	Number	
1	0	1	1	1	4	1	1	1	0	54	1	1	1	1	3	0	1	0	1	
1	0	1	1	0	118	1	1	0	1	8	1	1	1	0	12	0	1	1	1	1
1	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1	1	1	0	1	38	1	1	0	0	12
0	1	1	1	0	4	1	0	1	0	49	1	1	0	0	11	1	1	1	1	107
						1	0	0	1	13	1	0	1	1	19					
						1	0	0	0	3	1	0	1	0	21					
											1	0	0	1	17					

一段目は、部分的なアンフォールディング過程を表す。エネルギー障壁名の列は、そのエネルギー障壁によって力のピークが出現したかどうかを、出現した場合には1で、そうでなかった場合には0で表す。'Number'列は、各行において1と0で表されている出現パターンが観察された数を示した。

表 S 16-3: N 端側からの強制アンフォールディングシミュレーションにおけるエネルギー障壁の出現パターン

Helices E & F, loop EF, helix G, and C-terminal loop									
133.6aa	145.1aa	147.7aa	150.5aa	178.0aa	197.6aa	204.4aa	218.8aa	226.8aa	Number
1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
1	0	1	0	1	1	0	1	1	1

一段目は、部分的なアンフォールディング過程を表す。エネルギー障壁名の列は、そのエネルギー障壁によって力のピークが出現したかどうかを、出現した場合には1で、そうでなかった場合には0で表す。'Number'列は、各行において1と0で表されている出現パターンが観察された数を示した。

部分に分かれていると捉える事が出来る。

N 末端側からの引き抜きでは、力のピークの出現パターンは、二つの部分に分けて調査した。一方は、アンフォールディング過程全体をヘリックス AB, CD, EF, 及び G という四つの部分に分けて調査するものである。この場合では、(i) の事例の全ての結果と (ii) の事例のヘリックス AB 及び CD のアンフォールディング過程の結果とを合わせて調査した。結果は表 S16-2 に示した。も

う一方では、(ii) の事例のヘリックス EFG のアンフォールディング過程の結果の部分のみを解析した。結果は表 S16-3 に示した。

謝辞

本研究は、多くの方々の支援により遂行する事ができた。ここに深く感謝申し上げますと共に、もし仮に将来筆者が支援すべき立場にあった場合には、支援して下さった方々と同様に振る舞う事を誓う。

筆者の指導教員である倭剛久先生は、本研究がまとまらず行く宛の無い筆者を、大学院研究生として迎え入れて下さった。そして研究全般、特に、計算機科学方面からの議論、そして、副論文の作成について丁寧に御指導いただいた。

筆者が以前に在籍していた研究室(名大院 工学研究科 マテリアル理工学専攻 美宅研究室)での指導教員であった美宅成樹先生には、本研究のテーマを与えていただいた。そして、美宅先生が本学を退職されるまでの間、「辛抱強く」指導していただいた。さらに退職後も筆者との議論を幾度も重ね、本論文の完成の最後まで筆者を支援し、導いて下さった。

筆者の所属する TB 研究室の岡本先生を始めとして、木村さん、榮さん他、TB 研所属の皆様には、TB 研コロキウムを通して本研究への意見をたくさんいただいた。そして、本論文の完成に手間取り焦る筆者を、励まし、勇気づけて下さった。

筆者の父、山田保男、そして母、山田光子には、本論文の完成まで気長に支援を続けていただいた。筆者は博士論文の執筆の為に、一般的な修業年数である3年を越え、10年を費やしてしまった。父母はさぞかし心配だったと思う。修業年数が5年を越える当たりから、父母の心配は増大したようである。その心配に対し筆者は「後ちょっとだから、山頂はもうすぐそこだから」と答えてきたのだが、結果としてかなりの時間がかかってしまった。この事についてはお詫び申し上げます。しかしながら、本研究の途中ぐらいから、筆者の目には常に「山頂はもうすぐそこ」と映っていたのは本当である。

参考文献

- [1] Anders Krogh, Bjorn Larsson, Gunnar Von Heijne, and Erik LL Sonnhammer. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, Vol. 305, No. 3, pp. 567–580, 2001.
- [2] Ryusuke Sawada and Shigeki Mitaku. Biological meaning of dna compositional biases evaluated by ratio of membrane proteins. *Journal of biochemistry*, Vol. 151, No. 2, pp. 189–196, 2012.
- [3] Dieter Oesterhelt and Walther Stoerkenius. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 70, No. 10, pp. 2853–2857, 1973.
- [4] Richard H Lozier, Werner Niederberger, Roberto A Bogomolni, Sanbao Hwang, and Walther Stoerkenius. Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, halobacterium halobium cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, Vol. 440, No. 3, pp. 545–556, 1976.
- [5] Meyer B Jackson and Julian M Sturtevant. Phase transitions of the purple membranes of halobacterium halobium. *Biochemistry*, Vol. 17, No. 5, pp. 911–915, 1978.
- [6] Matthias Rief, Mathias Gautel, Filipp Oesterhelt, Julio M Fernandez, and Hermann E Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by afm. *science*, Vol. 276, No. 5315, pp. 1109–1112, 1997.
- [7] Daniel J Müller, J Bernard Heymann, Filipp Oesterhelt, Clemens Möller, Hermann Gaub, Georg Büldt, and Andreas Engel. Atomic force microscopy of native purple membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, Vol. 1460, No. 1, pp. 27–38, 2000.
- [8] Patrick LTM Frederix, Patrick D Bosshart, and Andreas Engel. Atomic force microscopy of biological membranes. *Biophysical journal*, Vol. 96, No. 2, pp. 329–338, 2009.
- [9] F Oesterhelt, D Oesterhelt, M Pfeiffer, A Engel, HE Gaub, and DJ Müller. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science*, Vol. 288, No. 5463, pp. 143–146, 2000.
- [10] Harald Janovjak, K Tanuj Sapra, Alexej Kedrov, and Daniel J Müller. From valleys to ridges: exploring the dynamic energy landscape of single membrane proteins. *ChemPhysChem*, Vol. 9, No. 7, pp. 954–966, 2008.
- [11] Christian A Bippes and Daniel J Muller. High-resolution atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. *Reports on Progress in Physics*, Vol. 74, No. 8, p. 086601, 2011.
- [12] Harald Janovjak, Jens Struckmeier, Maurice Hubain, Alexej Kedrov, Max Kessler, and Daniel J Müller. Probing the energy landscape of the membrane protein bacteriorhodopsin. *Structure*, Vol. 12, No. 5, pp. 871–879, 2004.
- [13] Jean-Luc Popot, Sue-Ellen Gerchman, and Donald M Engelman. Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: A thermodynamically controlled two-stage process. *Journal of molecular biology*, Vol. 198, No. 4, pp. 655–676, 1987.
- [14] Jean-Luc Popot and Donald M Engelman. Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*, Vol. 29, No. 17, pp. 4031–4037, 1990.
- [15] John F Hunt, Parshuram Rath, Kenneth J Rothschild, and Donald M Engelman. Spontaneous, ph-dependent membrane insertion of a transbilayer α -helix. *Biochemistry*, Vol. 36, No. 49, pp. 15177–15192, 1997.
- [16] Jean-Luc Popot and Donald M Engelman. Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annual review of biochemistry*, Vol. 69, No. 1, pp. 881–922, 2000.
- [17] Walther Stoerkenius and Roberto A Bogomolni. Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annual review of biochemistry*, Vol. 51, No. 1, pp. 587–616, 1982.
- [18] Ulrich Haupts, Jörg Tittor, and Dieter Oesterhelt. Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, Vol. 28, No. 1, pp. 367–399, 1999.
- [19] K Tanuj Sapra, G Prakash Balasubramanian, Dirk Labudde, James U Bowie, and Daniel J Muller. Point mutations in membrane proteins reshape energy landscape and populate different unfolding pathways. *Journal of molecular biology*, Vol. 376, No. 4, pp. 1076–1090, 2008.
- [20] K Tanuj Sapra, Jana Doehner, V Renugopalakrishnan, Esteve Padrós, and Daniel J Muller. Role of extracellular glutamic acids in the stability and energy landscape of bacteriorhodopsin. *Biophysical journal*, Vol. 95, No. 7, pp. 3407–3418, 2008.
- [21] Max Kessler and Hermann E Gaub. Unfolding barriers in bacteriorhodopsin probed from the cytoplasmic and the extracellular side by afm. *Structure*, Vol. 14, No. 3, pp. 521–527, 2006.
- [22] Alexej Kedrov, Harald Janovjak, K Tanuj Sapra, and Daniel J Müller. Deciphering molecular interactions of native membrane proteins by single-molecule force spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, Vol. 36, pp. 233–260, 2007.
- [23] Daniel J Müller, Max Kessler, Filipp Oesterhelt, Clemens Möller, Dieter Oesterhelt, and Hermann Gaub. Stability of bacteriorhodopsin α -helices and loops analyzed by single-molecule force spectroscopy. *Biophysical journal*, Vol. 83, No. 6, pp. 3578–3588, 2002.
- [24] David A Cisneros, Dieter Oesterhelt, and Daniel J Müller. Probing origins of molecular interactions stabilizing the membrane proteins halorhodopsin and bacteriorhodopsin. *Structure*, Vol. 13, No. 2, pp. 235–242, 2005.
- [25] David A Cisneros, Leoni Oberbarnscheidt, Angela Pannier, Johann P Klare, Jonne Helenius, Martin Engelhard, Filipp Oesterhelt, and Daniel J Muller. Transducer binding establishes localized interactions to tune sensory rhodopsin ii. *Structure*, Vol. 16, No. 8, pp. 1206–1213, 2008.
- [26] K Tanuj Sapra, Paul S-H Park, Slawomir Filipek, Andreas Engel, Daniel J Müller, and Krzysztof Palczewski. Detecting molecular interactions that stabilize native bovine rhodopsin. *Journal of molecular biology*, Vol. 358, No. 1, pp. 255–269, 2006.
- [27] Clemens Möller, Dimitrios Fotiadis, Kitaru Suda, Andreas Engel, Max Kessler, and Daniel J Müller. Determining molecular forces that stabilize human aquaporin-1. *Journal of structural biology*, Vol. 142, No. 3, pp. 369–378, 2003.
- [28] Alexej Kedrov, Christine Ziegler, Harald Janovjak, Werner Kühlbrandt, and Daniel J Müller. Controlled unfolding and refolding of a single sodium-proton antiporter using atomic force microscopy. *Journal of molecular biology*, Vol. 340, No. 5, pp. 1143–1152, 2004.
- [29] Harald Janovjak, Max Kessler, Dieter Oesterhelt, Hermann Gaub, and Daniel J Müller. Unfolding pathways of native bacteriorhodopsin depend on temperature. *The EMBO journal*, Vol. 22, No. 19, pp. 5220–5229, 2003.
- [30] K Tanuj Sapra, Hüseyin Besir, Dieter Oesterhelt, and Daniel J Muller. Characterizing molecular interactions in different bacteriorhodopsin assemblies by single-molecule force spectroscopy. *Journal of molecular biology*, Vol. 355, No. 4, pp. 640–650, 2006.
- [31] Kislun Voitchovsky, Sonia Antoranz Contera, and JF Ryan. Electrostatic and steric interactions determine bacteriorhodopsin single-molecule biomechanics. *Biophysical journal*, Vol. 93, No. 6, pp. 2024–2037, 2007.
- [32] Michele Seeber, Francesca Fanelli, Emanuele Paci, and Amedeo Caffisch. Sequential unfolding of individual helices of bacteriorhodopsin observed in molecular dynamics simulations of extraction from the purple membrane. *Biophysical journal*, Vol. 91, No. 9, pp. 3276–3284, 2006.
- [33] Francesca Fanelli and Michele Seeber. Structural insights into retinitis pigmentosa from unfolding simulations of rhodopsin mutants. *The FASEB Journal*, Vol. 24, No. 9, pp. 3196–3209, 2010.
- [34] Christian Kappel and Helmut Grubmüller. Velocity-dependent mechanical unfolding of bacteriorhodopsin is governed by a dynamic interaction network. *Biophysical journal*, Vol. 100, No. 4, pp. 1109–1119, 2011.

- [35] Marek Cieplak, Sławomir Filipek, Harald Janovjak, and Krystiana A Krzyśko. Pulling single bacteriorhodopsin out of a membrane: Comparison of simulation and experiment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Vol. 1758, No. 4, pp. 537–544, 2006.
- [36] Shiho Kawamura, Alejandro T Colozo, Daniel J Müller, and Paul S-H Park. Conservation of molecular interactions stabilizing bovine and mouse rhodopsin. *Biochemistry*, Vol. 49, No. 49, pp. 10412–10420, 2010.
- [37] Mariusz Milik and Jeffrey Skolnick. Insertion of peptide chains into lipid membranes: An off-lattice monte carlo dynamics model. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Vol. 15, No. 1, pp. 10–25, 1993.
- [38] A Baumgärtner. Insertion and hairpin formation of membrane proteins: a monte carlo study. *Biophysical journal*, Vol. 71, No. 3, pp. 1248–1255, 1996.
- [39] Michael W Maddox and Marjorie L Longo. A monte carlo study of peptide insertion into lipid bilayers: equilibrium conformations and insertion mechanisms. *Biophysical journal*, Vol. 82, No. 1, pp. 244–263, 2002.
- [40] Amit Kessel, Dalit Shental-Bechor, Turkan Haliloglu, and Nir Ben-Tal. Interactions of hydrophobic peptides with lipid bilayers: Monte carlo simulations with m2 δ . *Biophysical journal*, Vol. 85, No. 6, pp. 3431–3444, 2003.
- [41] Amit Kessel, Turkan Haliloglu, and Nir Ben-Tal. Interactions of the m2 δ segment of the acetylcholine receptor with lipid bilayers: A continuum-solvent model study. *Biophysical journal*, Vol. 85, No. 6, pp. 3687–3695, 2003.
- [42] Linus Pauling. *The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals: an introduction to modern structural chemistry*, Vol. 3. Cornell university press Ithaca, NY, 1960.
- [43] Mark A Roseman. Hydrophilicity of polar amino acid side-chains is markedly reduced by flanking peptide bonds. *Journal of molecular biology*, Vol. 200, No. 3, pp. 513–522, 1988.
- [44] Irving M Klotz and James S Franzen. Hydrogen bonds between model peptide groups in solution. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 84, No. 18, pp. 3461–3466, 1962.
- [45] Donald L Ermak and JA McCammon. Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *The Journal of chemical physics*, Vol. 69, No. 4, pp. 1352–1360, 1978.
- [46] L-O Essen, R Siegert, Wolf D Lehmann, and Dieter Oesterhelt. Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 95, No. 20, pp. 11673–11678, 1998.
- [47] Dmitriy Frishman and Patrick Argos. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Vol. 23, No. 4, pp. 566–579, 1995.
- [48] Darin M Taverna and Richard A Goldstein. Why are proteins marginally stable? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Vol. 46, No. 1, pp. 105–109, 2002.
- [49] Russell E Jacobs and Stephen H White. The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry*, Vol. 28, No. 8, pp. 3421–3437, 1989.
- [50] William C Wimley and Stephen H White. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature structural biology*, Vol. 3, No. 10, pp. 842–848, 1996.
- [51] Harald Janovjak, Helene Knaus, and Daniel J Muller. Transmembrane helices have rough energy surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 129, No. 2, pp. 246–247, 2007.
- [52] Alexej Kedrov, Michael Krieg, Christine Ziegler, Werner Kuhlbrandt, and Daniel J Muller. Locating ligand binding and activation of a single antiporter. *EMBO reports*, Vol. 6, No. 7, pp. 668–674, 2005.
- [53] Alexej Kedrov, Susanne Wegmann, Sander HJ Smits, Panchali Goswami, Hella Baumann, and Daniel J Muller. Detecting molecular interactions that stabilize, activate and guide ligand-binding of the sodium/proton antiporter mjhnp1 from *methanococcus jannaschii*. *Journal of structural biology*, Vol. 159, No. 2, pp. 290–301, 2007.
- [54] Christian A Bippes, Antra Zeltina, Fabio Casagrande, Merce Ratera, Manuel Palacin, Daniel J Muller, and Dimitrios Fotiadis. Substrate binding tunes conformational flexibility and kinetic stability of an amino acid antiporter. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, No. 28, pp. 18651–18663, 2009.
- [55] Harald Janovjak, Alexej Kedrov, David A Cisneros, K Tanuj Sapra, Jens Struckmeier, and Daniel J Muller. Imaging and detecting molecular interactions of single transmembrane proteins. *Neurobiology of aging*, Vol. 27, No. 4, pp. 546–561, 2006.
- [56] Wendy D Cornell, Piotr Cieplak, Christopher I Bayly, Ian R Gould, Kenneth M Merz, David M Ferguson, David C Spellmeyer, Thomas Fox, James W Caldwell, and Peter A Kollman. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 117, No. 19, pp. 5179–5197, 1995.
- [57] Anne Louise Morris, Malcolm W MacArthur, E Gail Hutchinson, and Janet M Thornton. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Vol. 12, No. 4, pp. 345–364, 1992.
- [58] Albert Leo, Corwin Hansch, and David Elkins. Partition coefficients and their uses. *Chemical reviews*, Vol. 71, No. 6, pp. 525–616, 1971.
- [59] Michel C Maillard, Michael E Perlman, Oved Amitay, Deborah Baxter, David Berlove, Sonia Connaughton, James B Fischer, Jun Qing Guo, Lain-Yen Hu, Robert N McBurney, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of conformationally constrained analogues of n, n'-diaryl- and n-aryl-n-alkylguanidines as potent inhibitors of neuronal na⁺ channels. *Journal of medicinal chemistry*, Vol. 41, No. 16, pp. 3048–3061, 1998.
- [60] Yasuhiko Nozaki and Charles Tanford. Examination of titration behavior. *Methods in enzymology*, Vol. 11, pp. 715–734, 1967.
- [61] Michael H Abraham, Harpreet S Chadha, Gary S Whiting, and Robert C Mitchell. Hydrogen bonding. 32. an analysis of water-octanol and water-alkane partitioning and the $\delta\log p$ parameter of seiler. *Journal of pharmaceutical sciences*, Vol. 83, No. 8, pp. 1085–1100, 1994.
- [62] Miguel X Fernandes and José García de la Torre. Brownian dynamics simulation of rigid particles of arbitrary shape in external fields. *Biophysical journal*, Vol. 83, No. 6, pp. 3039–3048, 2002.
- [63] Matthias Heinig and Dmitriy Frishman. Stride: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic acids research*, Vol. 32, No. suppl 2, pp. W500–W502, 2004.
- [64] Mark A Roseman. Hydrophobicity of the peptide c=O-h-n hydrogen-bonded group. *Journal of molecular biology*, Vol. 201, No. 3, pp. 621–623, 1988.
- [65] Irving M Klotz and Sutton B Farnham. Stability of an amide-hydrogen bond in an apolar environment. *Biochemistry*, Vol. 7, No. 11, pp. 3879–3882, 1968.
- [66] Gordon C Kresheck and Irving M Klotz. Thermodynamics of transfer of amides from an apolar to an aqueous solution. *Biochemistry*, Vol. 8, No. 1, pp. 8–12, 1969.
- [67] Stephen H White and William C Wimley. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, Vol. 1376, No. 3, pp. 339–352, 1998.
- [68] Alexey S Ladokhin and Stephen H White. Folding of amphipathic α -helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *Journal of molecular biology*, Vol. 285, No. 4, pp. 1363–1369, 1999.
- [69] Stephen H White and William C Wimley. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, Vol. 28, No. 1, pp. 319–365, 1999.
- [70] C Bustamante, JF Marko, ED Siggia, and S Smith. Entropic elasticity of lambda-phage dna. *Science*, Vol. 265, No. 5178, pp. 1599–1600, 1994.
- [71] Winchil LC Vaz, Robert M Clegg, and Dieter Hallmann. Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. a comparison of experiment with theory. *Biochemistry*, Vol. 24, No. 3, pp. 781–786, 1985.

- [72] Winchil LC Vaz, Federico Goodsaid-Zalduondo, and Ken Jacobson. Lateral diffusion of lipids and proteins in bilayer membranes. *FEBS letters*, Vol. 174, No. 2, pp. 199–207, 1984.