

課題名 (タイトル) :

変性状態における蛋白質構造の MD シミュレーション

利用者氏名 : ○油谷 克英, 田中 智之 (簡易利用のみ)

所属 : 放射光科学総合研究センター・生物試料基盤グループ

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

蛋白質の天然構造は X 線結晶構造解析、NMR などの手法を用いて精力的に研究がおこなわれているが、生理的条件下で天然状態と平衡にある変性状態の構造研究は大変に遅れている。この変性状態の実態を明らかにすることは、蛋白質の安定性の定量的評価、folding 機構などを理解するために重要な基本的課題である。研究の遅れている主な原因は、生理的条件下で平衡にある変性構造の存在確率が一般に天然構造の 10^8 分の 1 程度 ($\Delta G \approx 50 \text{kJ/mol}$) で、通常の状態では捕えることができないことに起因する。

しかし、私たちは、超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* の由来の Pyrrolidone Carboxyl Peptidase (以下 PCP と呼ぶ) は酸性領域で温度条件を制御するだけで、1 時間スケールのオーダーで refolding の進行を抑制して「生理的条件下で天然状態と平衡にある」変性状態を維持することが可能であることを示した。このことは、この PCP は天然状態と平衡にある変性状態の構造を理解する上で大変に好条件を備えたサンプルであることを示している。そこで、私たちは、この refolding を抑制して変性状態にある PCP の構造を NMR 測定によって解析した。この「生理的条件下で天然状態と平衡にある」PCP の変性状態を D1 状態と呼んでいる。

D1 状態の構造が詳細に NMR によって研究されていることは、MD simulation 研究に有利であると考えられる。完全ランダム構造から D1 状態への移行はいわゆる burst phase に相当して、 μsec オーダーで進行することが実験的に確かめられている。一般蛋白質の refolding の完成が sec のオーダーであるのと比べれば、 μsec オーダならコンピュータ実験が可能な範囲である。これらは、PCP の D1 状態の MD 実験が可能であるこ

とを示唆している。

本研究では、当面、D1 状態での、MD simulation での平衡構造をもとめ、その構造が NMR 実験で得られたものとの差異を検討することを考えている。

2. 具体的な利用内容、計算方法

「簡易利用」は実質 9 月から始まり、12 月には割り当ての演算時間を消費しきる見通しであったので、1 月からの「一般利用」を申請した。その演算時間も 3 月中旬にはすべて消費できる予定である。

本研究では、PCP の D1 状態 (生理的条件下の変性構造) を作成するために、700-1000K で変性させたのち、simulated annealing によって、温度を下げ、常温より少し高い温度で MD simulation を行った。実験的には、pH2.3 で 4°C 付近では、安定な D1 状態が得られることが知られている、そこで、コンピュータ実験では pH2.5 と pH2.0 でまず平衡温度をそれぞれ 350K と 300K に、更に、「一般利用」では、D1 状態により早く到達させるために 450K での MD simulation を行った。pH 条件は、WEB サーバー”H++” (<http://biophysics.cs.vt.edu>) により、非水素原子の 3 次元構造から蛋白質の protonation 状態を解析することで制御する。酸性領域での protonation は天然構造、種々の変性構造での擬似的結果を用いた。具体的な計算方法は、GROMACS を用いて MD simulation を行なった。並列計算で force field に AMBER99sb を用いた。「簡易利用」と合わせて、溶媒の水を含めた種々の条件で 400~700ns の MD simulation を行った。本報告書では、MD 条件の履歴の異なるものを、「試料状態」と呼ぶ。

3. 結果

1000K での MD simulation では、5ns 程度で PCP の二次構造は見かけ上ほぼ破壊されていた。

1000K で 3-10ns 後の数種の間隔での PCP を simulated annealing の初期構造として、300K(pH2.0)と 350K(pH2.5)で 200-350ns の MD を行った。その間、ほぼ半分の試料状態に関して、その構造での protonation の補正を行った。いずれの構造も部分的な二次構造の回復が見られた。更に、期待される平衡な D1 状態を効率的に得るために、これらの構造を一旦、700K で 1ns 走らせ、6 種の試料状態に関して、450K での MD simulation を 300-400ns 行った。このうち 3 種は途中の構造での protonation 補正を行ったものである。

得られた構造データの解析から次の特徴を見出すことができた。①450K の何れの試料状態においても、二次構造の形成と崩壊の繰り返しの中で Fig. 1 に示すように多くの二次構造の形成が確認できた。このことは、450K でも、適当なトポロジーに置かれれば二次構造が形成しうるこ

Fig. 1. PCP structure at 450K in the process of annealing simulation



とを示している。②慣性半径の MD trajectory は 300K 及び 350K と 450K の場合で異なった特徴が表れた。450K の場合は、いずれの初期構造にかかわらず 100ns 以降の慣性半径は 15-20nm の間に収斂した。しかし、低い温度では 200-300ns 後においてもそのような収斂は見られなかった。このことは、450K において、100ns 程度で、天然構造に近い慣性半径に、収斂することを示している。③凡てのデータに関して、PCA 解析を行ったところ、450K の 1 種に、Fig. 2A に示すように状態間を素早く行き来する平衡構

造が見られた。この条件で、温度を下げれば、課題の PCP の D1 状態である可能性を秘めている。参考までに、同じ条件の 350K での PCA 解析の結果を Fig. 2B に示す。一方、他の 5 種の 450K での PCA 解析は、Fig. 2B に似たパターンを示した。しかし、450K で、更に MD を続ければ、Fig. 2A のような安定な平衡構造が得られる可能性が期待される。

Fig. 2A. PCA analysis of PCP structure at 450K

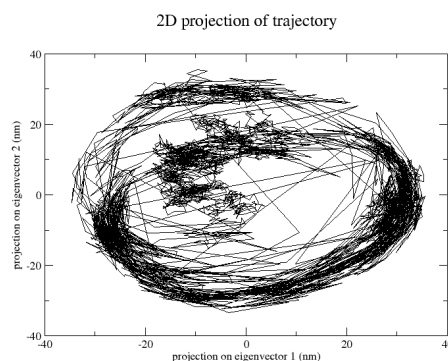
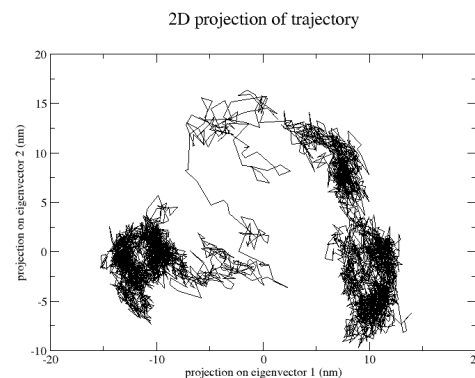


Fig. 2B. PCA analysis of PCP structure at 350K



4. まとめ

1000K で変性させた PCP を 300K ないし 400K で、約 200ns simulated annealing の後、再度 700K の 1ns MD simulation で、構造を緩め、更に 450K で MD simulation を行った。その結果、比較的高い温度である 450K に関わらず、二次構造が形成し、天然状態に近い慣性半径に折りたたまることが分かった。少しずつ異なった 6 種の試みの内、1 種に関して、いくつかの安定な構造間で揺らいでいる条件を PCA 解析で捕えることが

できた。これは、期待している D1 状態の 450K でのパターンの可能性がある。残りの 5 種も、更なる MD simulation の中で、そのような平衡系に陥る可能性を示唆している。

5. 今後の計画・展望

これまでに得られたデータ解析の結果は、引き続き 450K の MD simulation で、PCP の D1 状態を捕えることのできる可能性を示した。これらの構造を NMR 実験で得られた D1 状態の構造の特徴と対比させつつ、MD 実験を続行する。

具体的には、これまで進めてきた 6 種の異なった試料の状態からの 450K での MD simulation を継続させ、安定な平衡構造の検索を行う。Fig. 2A に示すような揺らぎの現象が他の 5 種でも起こるかどうかが確かめつつ進め、この揺らぎの実態と安定な平衡状態の実態を解明する。450K の MD trajectory の中から、PCA 解析と瞬時の二次構造の状態などを判断基準に安定な平衡状態を、検索、抽出する。その安定な平衡構造を出発物質として、300K(pH2.0)または 350K(pH2.5)に温度を下げて、MD simulation を続行する。より揺らぎの少ない安定な平衡構造が得られるだろう。それらの構造が NMR 実験で得たものにどの程度近似しているかを検討する。

PCP の D1 状態の構造は、生理的条件下で天然構造と平衡にある変性構造と見なすことができるので、この MD simulation による PCP の構造解析は他の蛋白質の天然状態と平衡にある変性状態の構造解析の規範となりうる。