

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

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* 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変性状態からの 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。この D1 状態の構造は、NMR 実験から「N 端 1-113 残基は disorder 状態で、ほとんど  $\beta$  シートは観察されない、一方、C 端 114-208 残基はマイクロからミクロ秒でのタイムスケールで揺らいでいるが天然状態の  $\alpha 4$  ヘリックスと  $\alpha 6$  ヘリックスが比較的安定に存在するいわゆる molten globule 状態である」ことが知られている (*Biochemistry* 51, 6086(2012))。

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、マイクロ秒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 の完成が秒のオーダーであるのと比べれば、マイクロ秒オーダー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 での平衡構造をモデリングし、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

PCP の D1 状態 (生理的条件下での変性構造) 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。NMR 実験では、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、D1 状態により早く到達させるために 450K での MD simulation を行い、その内から適宜、400K でも行った。pH 条件は、WEB ソフトウェア "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 を用いて並列 MD simulation を行なった。force field には AMBER99sb を用いた。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

今年度は、前年度に続き、可能な限り長時間の MD simulation を 450K と 400K で行い、安定な D1 状態の構造を検索した。

これと並行して、基礎的データとして、PCP の天然構造から出発した 450K での MD simulation

によって、どのような構造崩壊の過程を経て、その後の揺らぎ（平衡な構造）が起こるか調べた。Fig1A に示すように、6 個あるヘリックスの内  $\alpha 1, \alpha 3, \alpha 5$  ヘリックスは 300ns でほぼ崩壊するが、 $\alpha 2, \alpha 4, \alpha 6$  ヘリックスは 1100-1300ns まで崩壊しないことを示している。しかし、 $\beta$ シートは Fig1B に示すように、1600-1800ns でほぼ天然構造は崩壊するが新たに安定な $\beta$ シートが出現することを示している。図示していないが、一旦崩壊したヘリックスも他の 450K での simulation に見られたように比較的安定な推移が観察されている。

pH2.5 のある試料状態で、450K、3000ns 以上の MD simulation の内、結果的に PCP の N 端ドメインの $\beta$ シート含量が最低で、 $\alpha 4, \alpha 6$ ヘリックスが比較的安定な状態は250ns 付近であった。この時点での構造を初期構造として 400K での MD simulation を行った。この試料状態を PCP\_A250 と呼ぶ。その結果は Fig2A, B, C, D に示す。Fig2A と Fig2B は PCP\_A250 の 3250ns 間の $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ ストランドの盛衰の変化を緑色の濃さで表示している。Fig2C はトータルのヘリックスとストランドの経時変化を示す。特に、ストランドは N 端（1-113 残基）ドメインを区別して示している。全体としてヘリックスの減少傾向とストランドの増加傾向が見られるが、N 端ドメインのストランドは揺らいでいるが、盛衰の一方向的な傾向は見られない。Fig2D は各残基の MD、3250ns 間の二次構造の平均値を示す。他の図と同様に黄色の下地で示された $\alpha$ -1、 $\beta$ -1……の領域は結晶構造での二次構造残基を示す。そのナンバリングは Fig.S1 と対応している。大きな安定なヘリックスが 145 残基付近で、その含量は 85%にも達している。この大きなヘリックス構造は結晶構造の $\alpha 4$ ヘリックスの中間位置よりややN端側に寄っている。次の大きなヘリックスは190残基付近で含量は68%に達している。 $\alpha 6$ ヘリックスがややN端側にシフトしているように見える。PCP\_A250 の以外の 10 以上に試料状態で同様の解析を行ったが、このように NMR で測定された D1 状態の性質に比較的近い構造は見出されていない。

更に、D1 状態の性質により近い構造を見出すために、より短時間で効率よく計算する方法を用い

た。つまり、北尾らにより開発された Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) 法を用いた。これは、短いシミュレーションからターゲットに近い構造を選ぶことによって、目的の構造へ高効率で遷移させるカスケード型超並列シミュレーション法である。Fig3 のデータは試料状態 PCP\_A250 由来の 3 段目のカスケードから得たものである。Fig3A の図から明らかのように、N 端側の $\beta$ ストランドは顕著に減少している。矢印の 38ns と 72ns 付近ではストランド数は数残基以下である。4 段目のカスケードの初期構造の候補である。ヘリックス構造も高い値を示している。Fig3B は同じ試料での残基あたりのヘリックス含量を示している。PCP\_A250 の履歴を引いているため $\alpha 4$ と $\alpha 6$ ヘリックス共にN端側にシフトしている。75-100残基付近には結晶構造には見られないが安定なヘリックスが存在する。他の幾つかの試料状態から PaCS-MD 法を試みたがこの方法の優位性を示している。

この構造での判別のほかに、NMR 実験から N 端又は C 端で揺らぎの緩和時間が著しく異なっていることが分かっている。ヘリックスとストランド盛衰の緩和時間を計算したが、今のところ、両端での顕著な緩和時間の差異を見出すことはできていない。

#### 4. まとめ

蛋白質の生理的条件で、天然構造と平衡にある変性構造を明らかにするために、述べてきた条件で 400K での PCP の MD simulation を行なったところ、NMR 実験から得られた変性 (D1) 状態の特徴である $\alpha 4$ と $\alpha 6$ ヘリックスが観察された。さらに、PaCS-MD 法を駆使して、PCP の N 端ドメインでの $\beta$ ストランド含量も考慮することにより NMR 実験からえた構造により近い構造に近づけることに成功した。しかし、両端で大きく異なる緩和時間を持つ構造にはなっていない。

#### 5. 今後の計画・展望

これまでの PCP の 400K での MD simulation 実験において、比較的安定なヘリックスとシート構造が形成されることが分かった。また、より短時間で効率よく計算する方法としての PaCS-MD (Parallel Cascade Selection Molecular

Dynamics)法が本研究においても有効であると実証されたので、今後は、この方法を駆使して、出来るだけ多くのサンプリングの中から目的の二次構造を持ち、両端ドメインでの緩和時間の特徴ある差異を兼ね備えて構造を抽出する。それらの構造の特徴が比較的長い simulation 中に揺らぎの範囲内で持ちこたえる構造がみつければ、それが D1 状態の構造と言える。これまでの MD 実験からその発見の可能性は比較的高いと期待している。

Fig.1A. Decay curves of six  $\alpha$  helices at 450K MD from the native state of PCP at pH 2.5

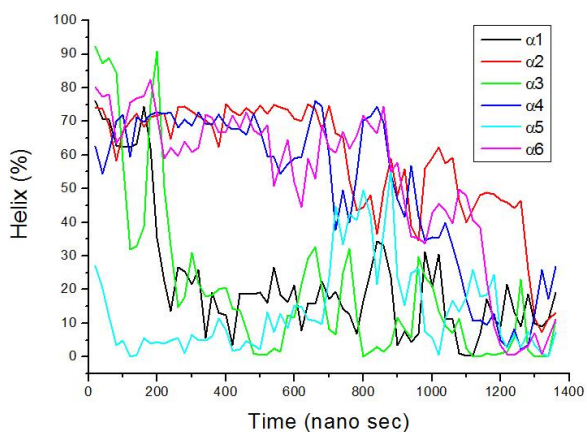


Fig.1B. MD simulation of PCP from native state at 450K and pH 2.5  
Color density responds to the content of  $\beta$ -strand. Horizontal axis: from 0 to 2975 ns.

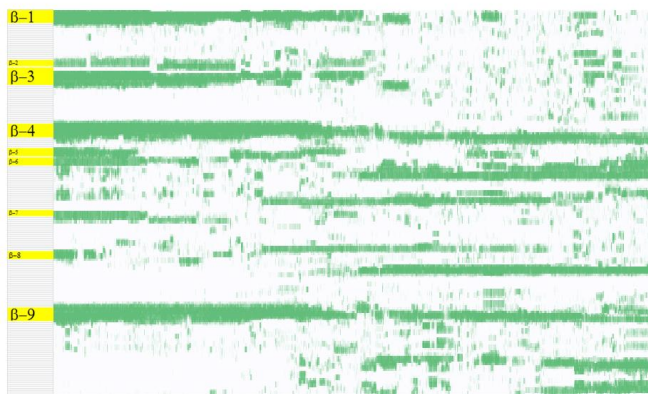


Fig.2A. MD simulation of PCP\_A250 at 400K and pH 2.5  
Color density responds to the content of  $\alpha$ -helix. Horizontal axis: from 0 to 3250 ns.

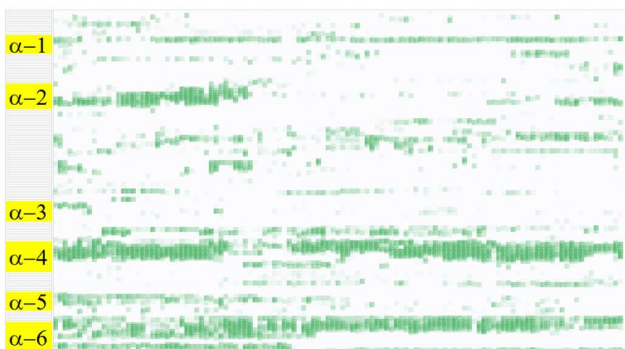


Fig.2B. MD simulation of PCP\_A250 at 400K and pH 2.5  
Color density responds to the content of  $\beta$ -strand. Horizontal axis: from 0 to 3250 ns.

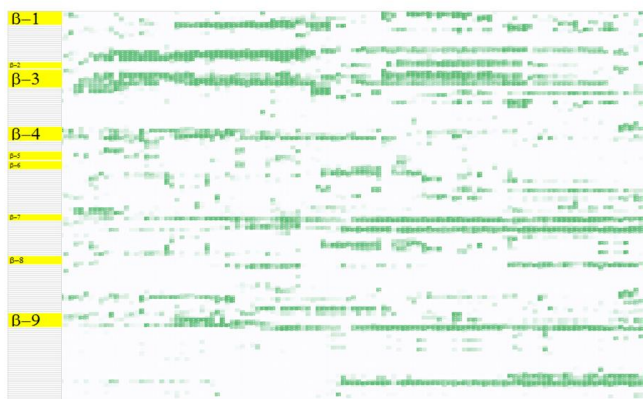


Fig.2C. Changes in content of secondary structures of PCP\_A250 at 400K MD simulation

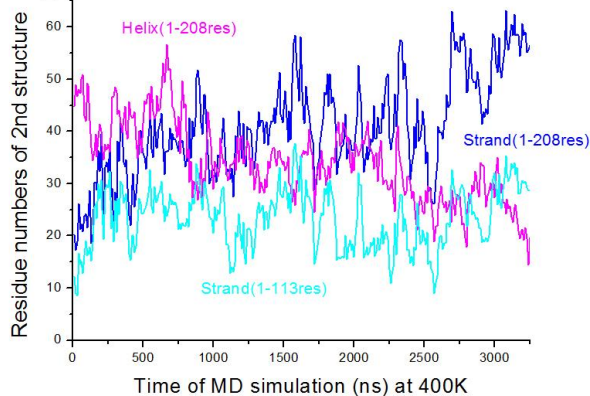
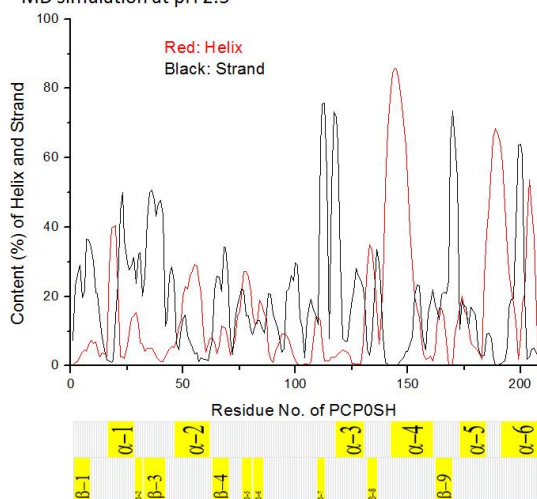


Fig.2D. Average secondary structures of PCP\_A250 during 3250ns MD simulation at pH 2.5



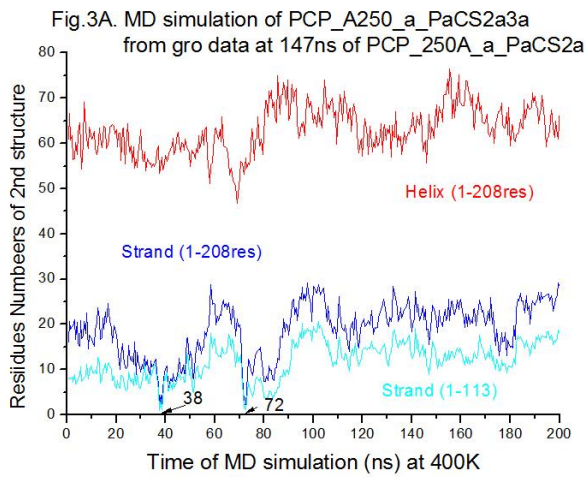


Fig.3B. Average secondary structures of PCP\_A250-a\_PaCS2a3a at 400K during 200ns

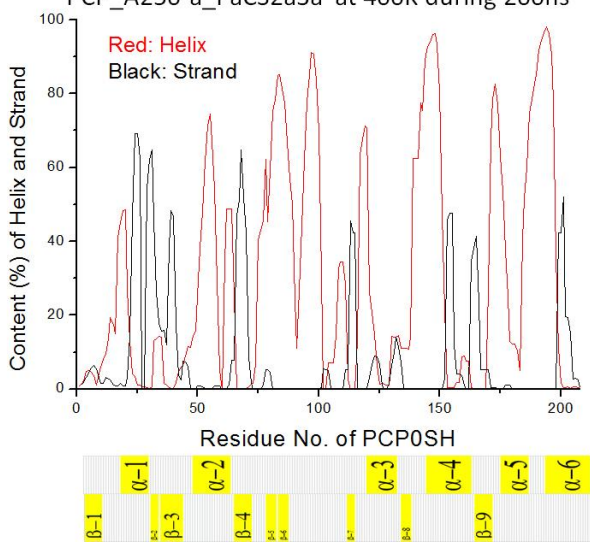
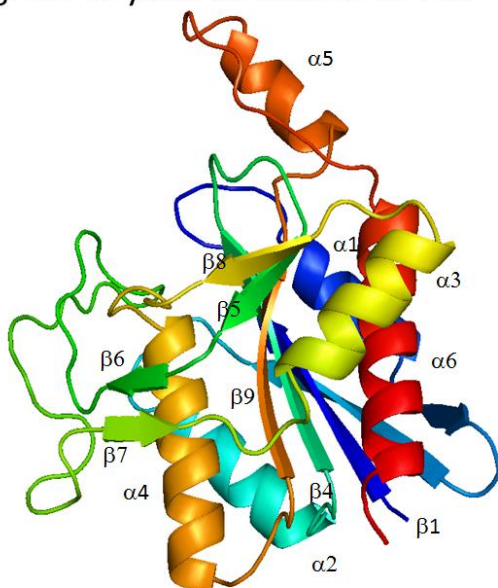


Fig. S1 Crystal structure of PCP



平成 27 年度 利用研究成果リスト

**【国際会議、学会などでの口頭発表】**

ポスター発表：第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015-6-26 徳島市にて。タイトル：生理的条件下で天然状態と平衡にある変性状態における蛋白質(PCP)構造の MD シミュレーション、発表者：油谷克英、内藤久志、城地保昌