

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。この変性構造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。今日、アミノ酸置換の手法で好みの配列を持った蛋白質を作成する方法は確立されているが、期待通りに安定性の高い構造を持つ蛋白質の設計指針は未だ確立されていない。このことは、蛋白質の安定化設計に天然構造のみしか利用できないことによる。もし、天然構造と平衡にある変性構造の理解が進めば安定化設計の質は飛躍的に向上するはずである。

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 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 β 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マイクロ秒

でのタイムスケールで揺らいているが天然状態の $\alpha 4$ ヘリックスと $\alpha 6$ ヘリックスが比較的安定に存在する」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、その構造と 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。具体的な計算方法は、GROMACS を用いて並列 MD simulation を行なった。並列計算で 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

2015 年度の利用報告書に述べたように、これまでの 450K 及び 400K での MD simulation の結果、NMR 実験から得られた D1 状態の構造の特徴である $\alpha 4$ と $\alpha 6$ ヘリックスが比較的安定な状態で観察されている。しかし、まだ、N 端 113 残基が disorder で C 端側が molten globule 状態であるという特徴ある構造を安定的に観察していない。北尾らが開発した Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) 法は、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が、PaCS-MD 法が本研究においても有効であることが前年度にすでに確かめている。

そこで、今年度は、PaCS-MD 法を駆使して、目的構造アンサンブルへの生成到達を目指した。PaCS-MD 法での「短いシミュレーション」での時間であるが前年度の経験から 200ns が適当であると思われた。その期間内に、比較的安定な $\alpha 4$ と $\alpha 6$ ヘリックスが存在し、N 端 113 残基の内、 β ストランドの形成数残基が限りなくゼロに近い構造を次の候補とする。Fig.1 にその例を示す。8 段目のカスケードでのある試料状態の 400K MD の trajectory (200ns) である。Fig1A と Fig1B はそれぞれ α ヘリックスと β ストランドの含量の推移が色の濃淡で示されている。Fig1C はそれらと N 端ドメイン (113 残基) 部分を区別している。N 端部分でのストランドの含量が非常に低いことがわかる。C 端部のヘリックス含量、特に $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ 付近を考慮して、次のカスケードへの構造を選ぶ。この場合、150ns の構造を次のステップの初期構造とした。またこの図から明らかにより 200ns 全域にわたり N 端ドメインの二次構造含量が低い。Fig1C の場合平均ストランドは 4.9 個、ヘリックスは 22.8 個であった。N 端のストランドが平均 7 以下を基順に、他の二次構造も考慮して MD 時間を 200ns ごとに徐々に延長させた。1000ns MD までは 200ns ごとにチェックして、条件から大きくずれたものは中止した。1000ns 以上は無条件で 2000ns まで継続した。現在、2000ns まで得られたデータは 7 試料状態である。前年度までの計算時間、および播磨のスパコン mini-K での試みなどを含めると、50

micro sec 以上になる。これは変性状態からモルテングロビュール状態への遷移の時間に匹敵する。

Fig2 と Fig3 に 2 つの試料状態での各残基のヘリックスとストランド形成の 2000ns MD の trajectory を示す。二次構造の盛衰の変化は緑色の濃さの濃淡で示している。左側には結晶構造での二次構造の部位を示す。緑色はストランド、赤色はヘリックス部分を示す。図に示していない他の 5 種の試料状態の結果も図示したものに似た挙動を示した。図から分かることは 400K での simulation では比較的ヘリックス及びストランドの形成・崩壊の変化が 2000ns 内でも頻繁に生起していることである。NMR 実験では D1 状態は 4°C 付近では 1 週間でも安定であるが温度を高めると、室温ではほぼ 1 日で N 状態に folding することが知られているので 400K MD でこのように頻度の高い揺らぎが生じるのも結果的には当然のことであろうと思われる。初期には 400K で比較的長い時間安定な構造を維持すると期待していたが温度が高いためにそのようになっていない。今後は simulation で得られた構造と NMR 実験で推定される構造の特徴と対比させることである。その解析の 2-3 の例を示す。Fig4 はある試料状態での 1000ns MD での各残基の平均のヘリックスとストランドの量を示している。Fig5A はある試料状態での残基 41-50 が他の残基とどの程度 contact しているかを示す。他の解析でも示されているが、N 端側の残基は隣り合った残基を除けば比較的 contact は少ないことを示唆している。この結果は D1 状態では N 端領域が disorder であるという NMR 解析の結果と一致する。しかし、Fig5B で示すように、残基 61-70 になると一次構造がかなり離れた残基間の contact も見られる。これらの解析により NMR 実験から特定されている離れた残基間の相互作用の変化も検討中である。

4. まとめ

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を用いて、PCP の D1 状態に近い構造で、7 つの試料状態で 2000ns MD データを取得することができた。これまでに試みた量は延べ数で 50 micro sec 以上になる。そのため取得したデータの中に目的のモデル構造が含まれてい

る確立は高い。400K での MD のために得られた 2000ns 間での二次構造の盛衰は激しいものがあった。その中から NMR 実験から得られた D1 状態に特徴ある構造に近いモデルを得るために膨大なデータを解析中である。

5. 今後の計画・展望

現在も、PCP の D1 状態の詳細構造の NMR 解析を富山大の水口峰之教授との協同研究が進んでいる。これらの新しく得られた NMR 実験データも考慮に入れつつ、これまでに得られた MD データの中から生理的条件下で天然構造と平衡にある変性構造 (D1 状態の構造) を明らかにする。この D1 状態では PCP の refolding 速度が大変抑制されるという事象は、ある特殊な相互作用に起因していると NMR 実験から推定されているが、今後の解析によってこれらの特殊な構造が simulation の中から判明できると期待できる。

Fig 1A. MD simulation of PCP at 400K during 200ns

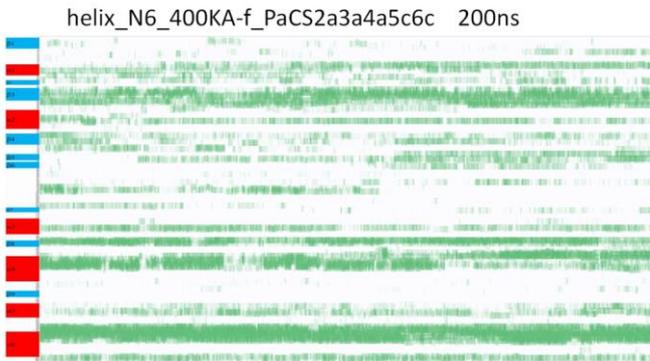


Fig 1B. MD simulation of PCP at 400K during 200ns strand_N6_400KA-f_PaCS2a3a4a5c6c. 200ns

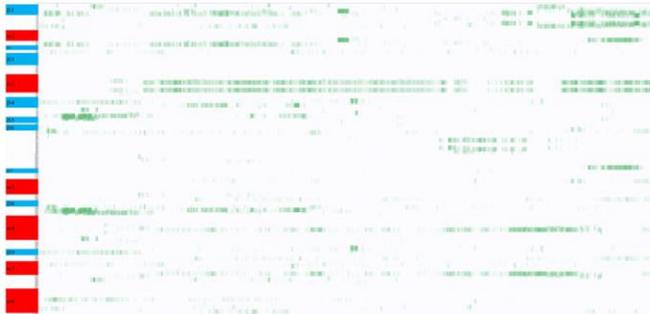


Fig 1C. Changes in the content of 2nd structure of PCP at 400K MD simulation

N6 400KA-f_PaCs2a3a4a5c6c from gro data 198.5ns of 400KA-f_PaCs2a3a4a5c

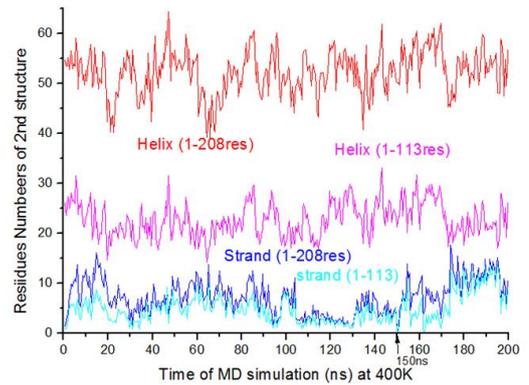


Fig 2A. MD simulation of PCP at 400K during 2000ns

helix_400KA-a_PaCS2a3a_2000ns_dt400

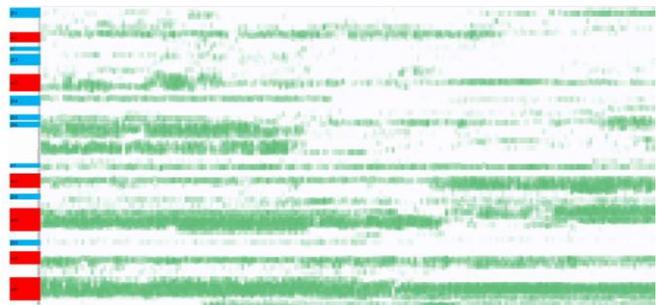


Fig 2B. MD simulation of PCP at 400K during 2000ns

strand_400KA-a_PaCS2a3a_2000ns_dt400



Fig 3A. MD simulation of PCP at 400K during 2000ns

helix_400KA-f_PaCS2a3a4a5c6c_2000ns_dt400

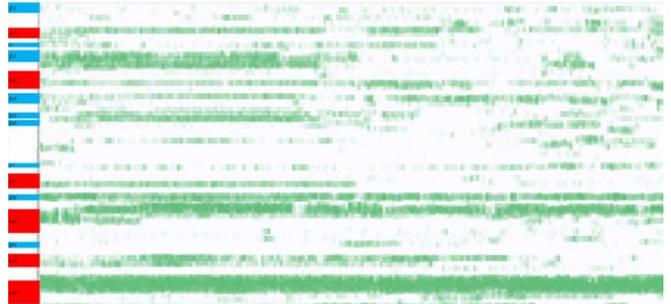


Fig 3B. MD simulation of PCP at 400K during 2000ns



Fig 4. Average 2nd structures of PCP at 400K during 1000 ns

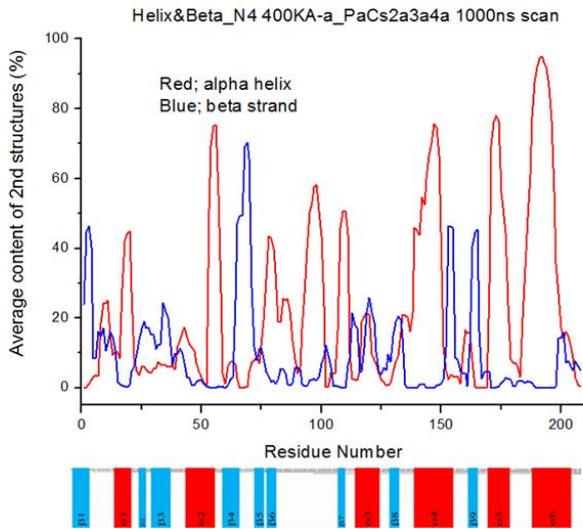


Fig 5A. Contact distance of 10 residues of PCP at 400K MD during 200ns

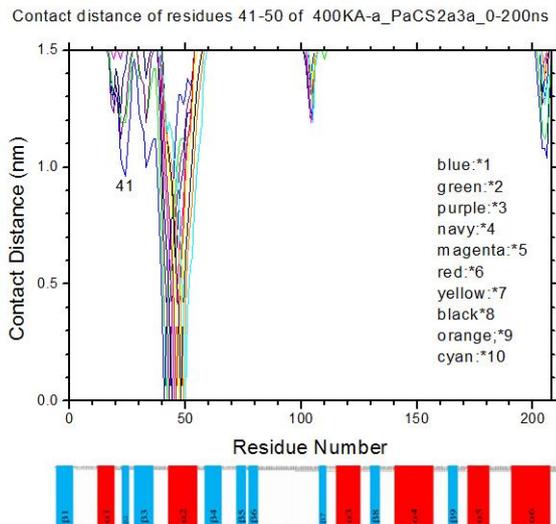


Fig 5B. Contact distance of 10 residues of PCP at 400K MD during 200ns

