

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状態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、 $\mu \text{sec}$  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、 $\mu \text{sec}$  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

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  $4^\circ\text{C}$  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 と、350K でも行った。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。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

昨年度に、6 種の試料状態に関して、450K での MD simulation を 300-400ns まで行うことができた。今年度は可能な限り長時間の simulation を行いその変化の状態を観察することに重点をおいた。450K の高い温度においても、 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シートなどの二次構造の形成と崩壊が観察されることが分かったので、その二次構造の形成と崩壊 (盛衰) の特徴を観察した。

Fig1 には試料状態 PH25A (pH2.5、750K で 1800ps 後に 450K に移した試料) の 450K での 1700ns までの  $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$ -ストランドの盛衰の MD trajectory を示す。Fig1A から明らかのように、天然構造の  $\alpha$ -4 と  $\alpha$ -6 付近には明瞭にヘリッ

クスの形成と崩壊が見て取れる。両ヘリックスは NMR 実験から D1 状態でも安定に存在していると推定されている。このことは、この付近でのヘリックスの形成が D1 状態生成の有無のメルクマールになることを示唆している。次に Fig2B の  $\beta$  ストランドの盛衰の状態を示す。この図から明らかなことは、 $\alpha$ -ヘリックスの盛衰に比べ、比較的長時間安定である  $\beta$  ストランドが多いことである。この trajectory は一旦誤った  $\beta$  シートが形成されるとそのシートが維持され天然構造への復帰が困難であることを示唆している。他の 5 種の試料状態からの trajectory においても、この PH25A と同じ傾向が読み取れた。このことは、天然構造と異なる安定な  $\beta$  シートの形成が蛋白質 folding の律速段階になることを示唆している。

Fig2 は Fig1A の trajectory の 245~250ns 間での  $\alpha$ -ヘリックスの平均値の値を天然構造のそれと比較したものである。残基番号 75 付近に天然構造にない比較的安定なヘリックスの形成が見られるが、 $\alpha$ -4 と  $\alpha$ -6 に続いて  $\alpha$ -2 にも部分的に比較的安定なヘリックスが見られた。そこで、この trajectory の 250ns での構造を初期構造として、350K と 400K での MD simulation を行った。それらを、試料状態 PH25A\_250ns と呼ぶ。

Fig3 には試料状態 PH25A\_250ns の 400K での 1300ns までの  $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$  ストランドの盛衰の MD trajectory を示す。Fig3A のヘリックス構造は盛衰が見られものの、天然構造の二次構造に対応する残基付近に比較的安定なヘリックス構造が見られる。特に  $\alpha$ -2 ヘリックスは崩壊するものの 700ns 付近で天然構造と同程度の長さのヘリックスが形成される。Fig3B に  $\beta$  ストランドの盛衰が示されている。安定に推移している部分は天然構造のストランドが位置している部位に多く見られる。但し、1100ns 付近から C 端付近の残基に天然構造に見られない位置でのストランドが見られる。このストランドは今後の観察が必要だが天然構造形成の律速になるであろうと推測できる。同様に、他の試料状態での 450K での MD trajectory の中から  $\alpha$ -4 と  $\alpha$ -6 に注目して構造を取り出し、温度を 400K に下げた MD を数種行っているが、類似の結果を得ている。

次に、pH2.5 での天然構造を初期構造として、450K で MD simulation を行った場合、二次構造のどの部位がより不安定かが問題となる。そこで、Fig4 には 450K での N 状態の構造からの  $\alpha$ -ヘリックスの崩壊の推移が示されている。まず、 $\alpha$ -5 が崩壊し、ついで  $\alpha$ -1、 $\alpha$ -3 が部分的に崩壊していく。比較的安定なのは  $\alpha$ -2、 $\alpha$ -4、 $\alpha$ -6 ヘリックスである。これは先に述べた 450K での simulation と対応する。 $\beta$  ストランドに関しては図示していないが、 $\beta$ -8、 $\beta$ -6、 $\beta$ -2 の比較的短いストランドから崩壊してく。

#### 4. 今後の計画・展望

これまでに得られたデータの特徴は、溶液実験ではほとんど二次構造が破壊されていると思われる高温、450K においても  $\alpha$ -ヘリックスとか  $\beta$  シート構造の形成と崩壊が観察されることである。このことは、生理的条件下 300K 水溶液中で平衡にある変性構造 (PCP では D1 構造と呼んでいる)、においても同様な二次構造の盛衰現象が起きていることを示唆している。いわゆるこの種の揺らぎは温度の上昇に比例して、二次構造の含量は減り、その盛衰の推移は激しくなるであろう。このことは、今回の 450K、400K、350K の結果でも示されている。そこで、今後の計画としては、この 3 種の温度で、いろいろな試料状態に関して、可能な限り長時間の MD simulation を行う。そして、 $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$  シート構造の形成と崩壊の変化の様子を、結晶構造の二次構造部位、NMR の実験結果を総合的に考量することによって、PCP の D1 構造を推定することが可能となると思われる。また結果の項で触れたように天然構造と異なる安定な  $\beta$  シート構造は protein folding の律速段階との関連で興味ある考察が可能となろう。

最後に、参考までに、PCP モノマーの二次構造部位を示した結晶構造を示す (Fig. S1)。また、Fig1. Fig3. Fig4 の左側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。

Fig. 1A. MD trajectory of  $\alpha$ -helix at 450K for PH25A

horizontal axis: from 0 to 1700 n sec  
vertical axis: residue number of PCP0SH from up to down  
Color density represents the content of  $\alpha$ -helix.

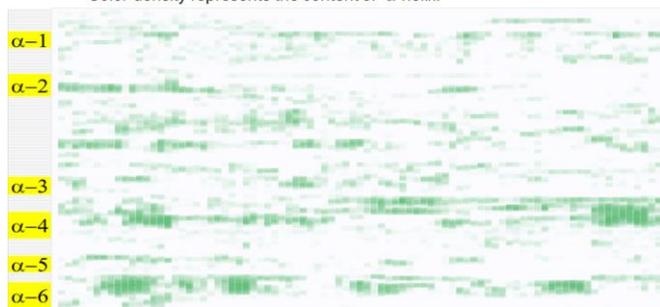


Fig. 1B. MD trajectory of  $\beta$ -strand at 450K for PH25A

horizontal axis: from 0 to 1700 n sec  
vertical axis: residue number of PCP0SH from up to down  
Color density represents the content of  $\beta$ -strand.

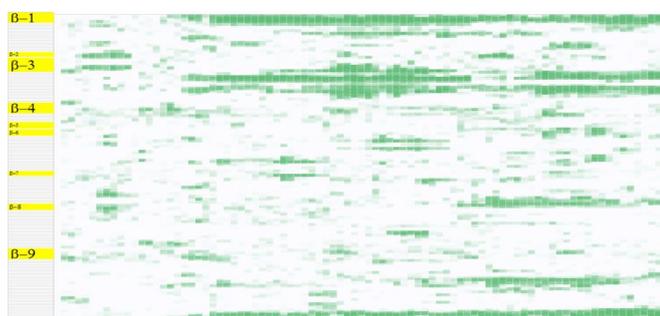


Fig. 2

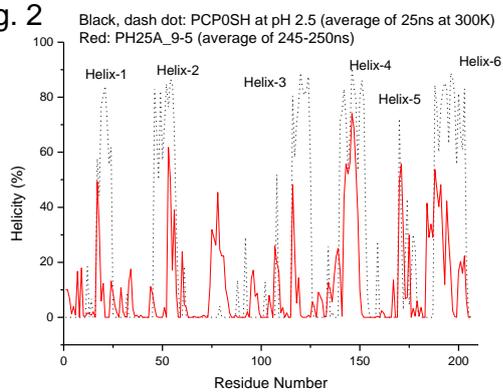


Fig. 3A. MD trajectory of  $\alpha$ -helix at 400K for PH25A\_250ns

horizontal axis: from 0 to 1300 n sec  
vertical axis: residue number of PCP from up to down  
Color density represents the content of  $\alpha$ -helix

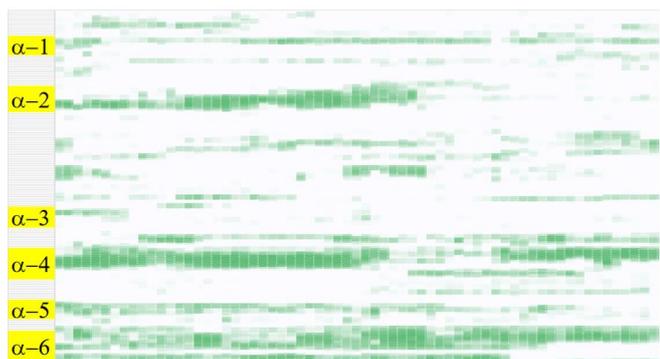


Fig.3B. MD trajectory of  $\beta$ -strand at 400K for PH25A\_250ns

horizontal axis: from 0 to 1300 n sec  
vertical axis: residue number of PCP from up to down  
Color density represents the content of  $\beta$ -strand.

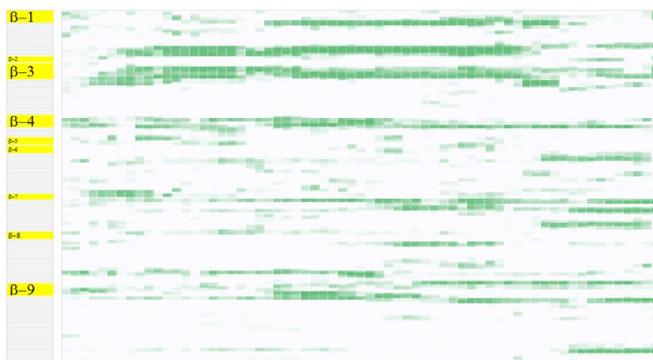


Fig 4. MD trajectory of  $\alpha$ -helix at 450K from native PCP at pH 2.5

horizontal axis: from 0 to 625n sec  
vertical axis: residue number of PCP0SH from up to down  
Color density represents the content of  $\alpha$ -helix.

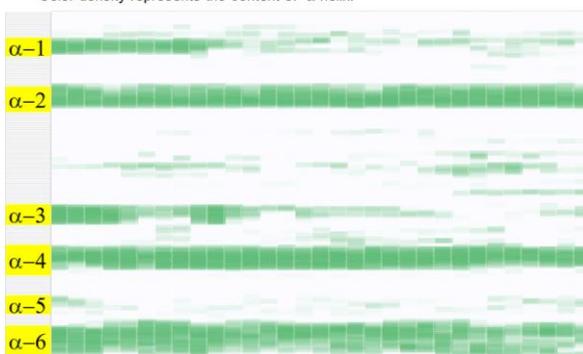


Fig. S1 Crystal structure of PCP

