

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

理研での所属研究室名: 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の重要な基礎的課題である。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。

2006 年、私たちは超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の CutA1 蛋白質の変性温度 (T_d) がほぼ 150°C であることを発見した。この蛋白質の T_d はこれまでに測定された値を 30°C 以上超える至上最高の値である。この蛋白質は安定性研究にとって、最適な試料であるのでいろいろと研究を進めた。大腸菌由来の CutA1 も 90°C 近くの高い T_d をもつ。大腸菌由来の CutA1 の 2 個の Cys 残基を Ala に置換した変異型を Ec_0SH と呼ぶ。この T_d は 85.6°C 。できるだけ少ない変異で安定性を高める種々の試みの中で 2 つの特徴ある変異型を見つけた。一つは Ec_0SH の疎水性変異型 (Ec_0SH_S11V/E61V)、Ec0VV と呼ぶ。Ec0VV の T_d は 113.2°C 。もう一つは Ec0VV の荷電性残基変異型 (Ec0VV_A39D/S48K/H72K/S82K/Q87R)、Ec0VV_6 と呼ぶ。Ec0VV_6 の T_d は 136.8°C 。この特徴ある 3 種、Ec_0SH、Ec0VV、Ec0VV_6 の変異型の熱変性状態での MD simulation の結果の比較から、疎水性残基ならびに荷電性残基が熱変性状態でどのような挙動をするかを明らかにし、蛋白質の安定化に変性構造がどのように寄与しているかを本研究では明らかにする。特に、荷電性残基が変性状態でどのように挙動するかが荷電残

基の蛋白質安定化に果たす役割を理解する要になっている。荷電性残基は変性状態でも相互作用して変性状態のエントロピーを低下させ安定化に寄与していると推論されるが、これらを本研究で解明する。

蛋白質の SS 架橋はその立体構造の安定化に重要な役割を果たしているが、その安定化の機構は、SS 結合が変性状態での構造の揺らぎを制限し、変性状態のエントロピーの低下を引き起こすことに起因すると信じられている。超好熱菌由来の蛋白質に多く含まれている荷電性残基が、変性状態で多くの塩結合を形成していることを解明されれば、SS 架橋による安定化の機構と同じ仕組みで、変性状態でのエントロピー低下に起因して、安定化に寄与していることが分かる。これが解明されれば、より安定な蛋白質の設計に、新たな大きな進展が期待できる。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究では大腸菌由来 CutA1 の 3 種の変異型、Ec_0SH、Ec0VV、Ec0VV_6 のホモ 3 量体の各サブユニットに関して、2000ns の MD simulation を 400K と 450K で行った。計算は GROMACS を用いて 2 種類の force field、GROMOS43a1 と AMBER99sb のそれぞれで行った。以下に述べる結果は、放射光科学総合研究センターの mini-K、研究室のワークステーションでの計算結果も含まれていることを記しておく。

3. 結果

CutA1 は Fig1A に示すように、3 量体であるので、熱変性の MD simulation は単量体 (Fig1B) を出発物質とした。Fig2A と Fig2B は三種の変異型の Ca 原子の 450K MD simulation での 2000 ns までの軌跡を示す。A と B は力場 GROMOS と AMBER の違いである。いずれも 200 ns 付近までに大きく構造の破壊が観測されるが、その破壊の程度は GROMOS の方が大きい。

その差異は 400K での MD でも同様に観察された。二次構造に注目すると、GROMOS の場合は、いずれの変異型も 500 ns 付近で α ヘリックスはほぼ崩壊しその後再形成は見られないが、AMBER の場合はヘリックスの崩壊再形成が最後 (2000ns) まで見られた。Fig3A に示すように、400K での GROMOS の場合、 α -1 ヘリックスのほぼ 8 割が安定に保持されたが、他の 2 つのヘリックスは 2 割以下に低下していた。一方、AMBER の場合、500K に於いても、ヘリックス構造は Fig3C に示すように GROMOS に比べ顕著な安定性を示し、含量で平均 5 割程度は維持していた。一方、 β シートに関しては、両力場とも天然構造の 6・8 割に匹敵する高さで崩壊と再形成を繰り返している。しかし、その再形成の β シートの対は天然構造のそれとは大きくかけ離れている。

Fig4 は 450K MD simulation (GROMOS) に於ける Ec0VV_6 の B サブユニット Asp39 の C γ atom と Lys87 の C ϵ atom 間の距離の時間変化を示す。一般に好ましいイオン対が 0.6nm 以内にあれば塩結合を形成しているといわれている。図に示すように両イオンは、450K、2000ns の MD 中に激しく揺らいでいるが、初期構造では 2.5nm 程度離れていたイオン間距離が 0.6nm 以下に近づき塩結合を形成したり、また大きく離れたりしていることを示している。そこで、Ec0VV_6 変異型に含まれている置換された 6 種の解離性残基について、2000ns の MD 中に好ましいイオン対のイオン間距離が 0.6nm 以下を占める割合を占有率(occupancy)と定義する。そのペア残基と占有率のパーセントを Table1 (GROMOS) と Table 2 (AMBER) に示す。比較のために天然構造(300K)でのそれらの塩結合の占有率も示されている。

Table1(GROMOS)の Arg88 は、450K の場合 15 種の好ましいペア残基と合計 126.4%の占有率で塩結合を形成していることを示す。値が 100%を超えているのは同時に 2 種類以上のペアと塩結合を形成していることを示す。6 種の平均の占有率は、450K、400K、300K でそれぞれ 91.8、91.3、140.1%であった。これらの結果は、450K と 400K に於いて、天然構造(300K)に比べ

それぞれ 65.5 と 65.2%の割合で塩結合を形成していることを示す。力場に AMBER を用いた結果を Table2 に示すが、6 種の平均の占有率は 450K、400K、300K に対してそれぞれ 58.1、54.0、98.4%で GROMOS の結果に比べ全温度でそれぞれ 4 割程度小さい値を示す。しかし、300K を基準にした場合は、450K と 400K の値は 59.0 と 54.9%で GROMOS の結果に近い値を示した。

以上の結果は、力場の違いに関わらず、450K ないしは 400K の熱変性状態で、Ec0VV_6 の構造の壊れの程度、二次構造の含量の差異を超えて、Ec0VV_6 は熱変性状態で一定の割合のイオン対(塩結合)を維持していることを示している。

4. まとめ

研究の目的は、生理的条件下で天然構造と平衡にある変性構造を明らかにすることであった。これらの構造は、molten globule に近い構造で、ヘリックスをも含むことが推定されている。本研究における 4 種の熱変性構造 (GROMOS と AMBER それぞれ 450K と 400K) のいずれが、目的の変性構造であるかは判定できないが、4 種の構造ともにいずれも同程度に高い、天然構造に比べ 6 割程度の好ましいイオン対 (塩結合) を形成していたことである。変性状態でもイオン対を形成しているということは、蛋白質の構造安定化に新しい機構を提案するものである。

変性状態でのイオン対の形成は、天然状態でのイオン対による安定化を相殺し、蛋白質の構造の不安定化に寄与していると思われるが、変性状態でのイオン対は変性構造の自由度を著しく阻害して変性状態のエントロピー低下をきたすと考えられる。この考えは、タンパク質分子内の SS 結合が変性状態のエントロピーを低下させ構造安定化に寄与していると考えのと同様の機構である。

一方、何故超好熱菌に異常に多くの荷電性残基が含まれているかは十分に説明できていなかったが、本研究はそれに回答を与えるものである。つまり、多くの荷電性残基は変性状態でイオン対を形成し、揺らぎの自由度を制限し、エントロピー低下に寄与していると思われる。さらに、変性状態でのイオン対形成によるエントロピー低下

の考えは、蛋白質の熱安定化設計のひとつの新しい指針となる。この方法は、変性状態で揺らいている荷電性残基が、天然構造でのそれと違って、必ずしも特定のペアとのイオン対形成を必要としないので、設計手法としては、非常に簡便であろう。

5. 今後の計画・展望

今回見つけた、変性状態でイオン対形成による蛋白質安定化の手法が実験科学者によって実証されることが期待される。

Fig. 1A Tertiary structures of Ec0VV_6 during MD simulations. Native trimer structure of Ec0VV_6 at 20 ns of 300 K MD simulation. Sticks represent targeted charged residues (gromos)

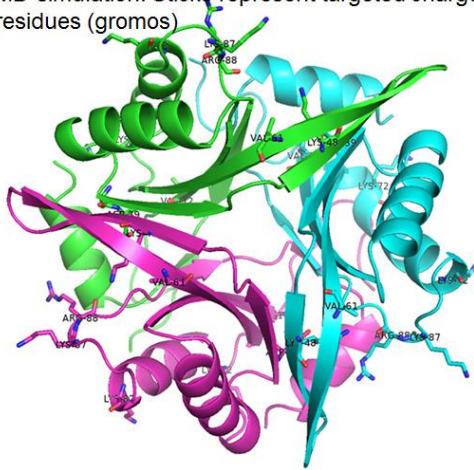


Fig. 1B. Monomer structure (A subunit) of Ec0VV_6 at 20 ns of 300 K MD simulation. Sticks represent targeted charged residues. Helices are numbered from the N-terminus. (gromos)

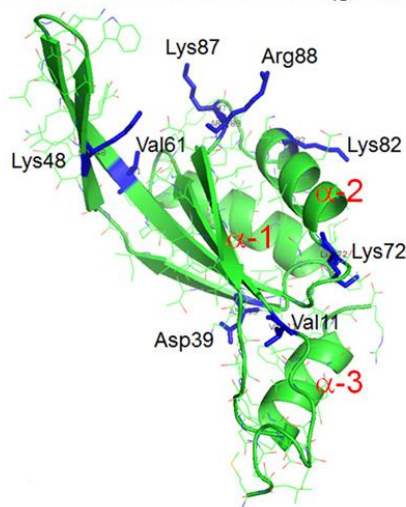


Fig. 1C Monomer structure (C subunit) of Ec0VV_6 at 500 ns of 450 K MD simulation. Red sticks represent targeted charged residues. (gromos)

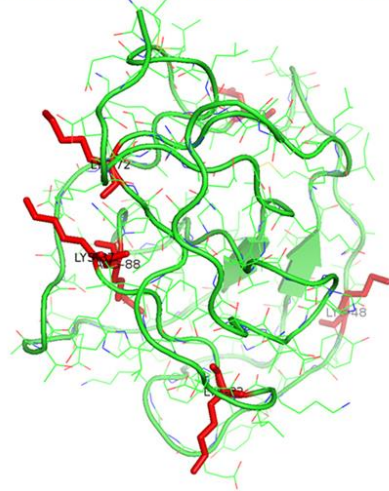


Fig. 2A Trajectory of rmsd of for 3 mutants of EcCutA1 at 450 K MD simulation (gromos)

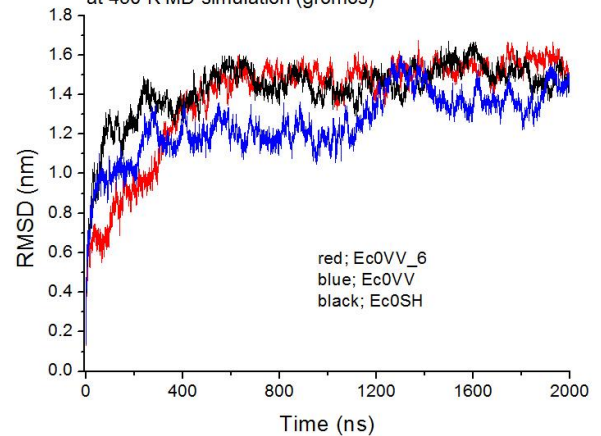


Fig. 2B Trajectory of rmsd of for 3 mutants of EcCutA1 at 450 K MD simulation (amber)

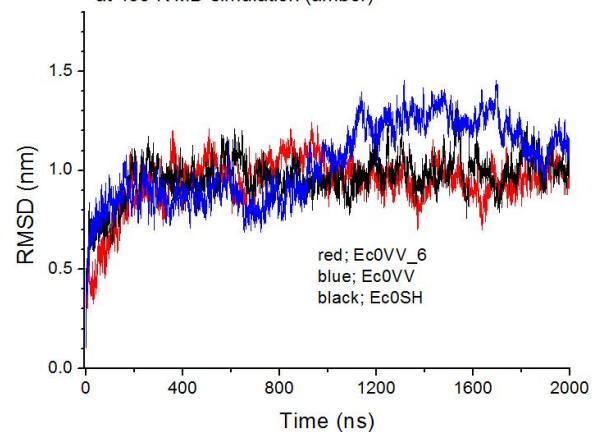


Fig. 3A Average helicity (%) of 3 mutants between 1500 and 2000 ns at 400K MD (gromos)

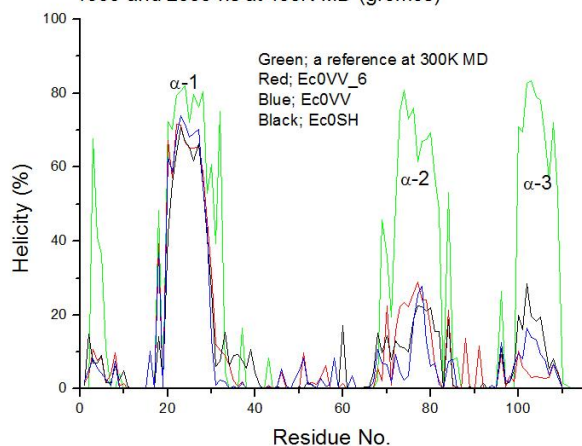


Fig. 3B Average helicity (%) of 3 mutants between 1500 and 2000 ns at 450K MD (gromos)

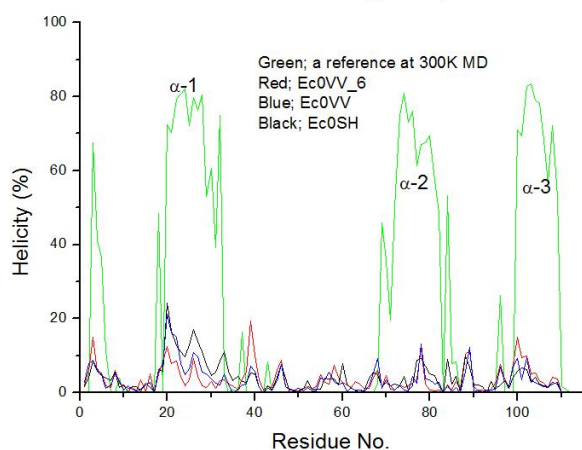


Fig. 3C Average helicity (%) of 3 mutants between 1500 and 2000 ns at 450K MD (Amber)

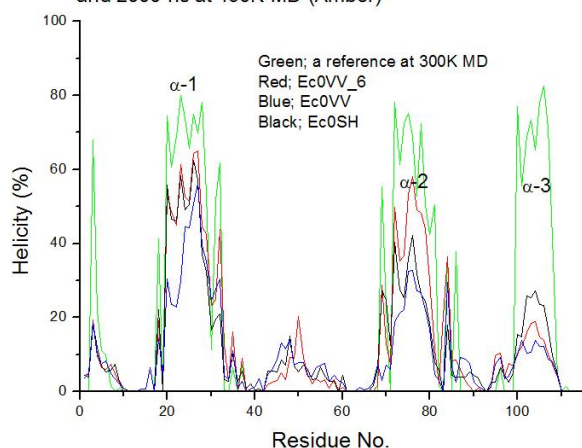
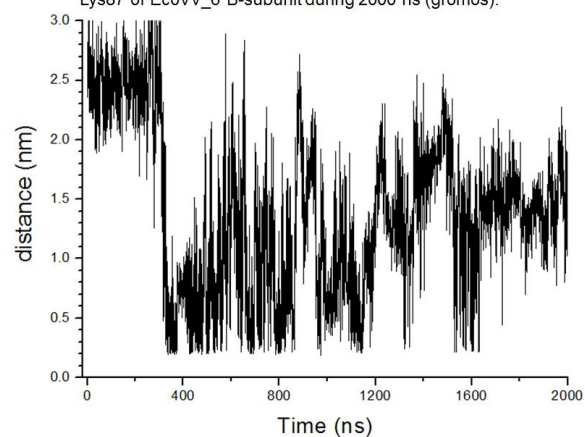


Fig. 4. Typical trajectory of changes in the distance between charged residues during 450 K MD simulation. The figure shows changes in distance between the C γ atom of Asp39 and the C ϵ atom of Lys87 of Ec0VV_6 B-subunit during 2000 ns (gromos).



平成 29 年度 利用報告書

Table 1. Percent occupancy of ion pairs (less than 0.6 nm) for substituted residues of Ec0VV_6 at 450, 400, and 300 K during MD simulation. (Gromos)

The values at 450 K and 400 K were taken during 1000ns of MD between (1.0 and 2.0 μ s) and represent an average of three subunits. Those at 300 K were obtained between 0.05 and 0.4 μ s.

(A)					(C)					(E)				
substituted residue	pair residue	450 K	400 K	300 K	substituted residue	pair residue	450 K	400 K	300 K	substituted residue	pair residue	450 K	400 K	300 K
Arg88	Asp3	1.1	0.0		Lys48	Asp3	1.7			Lys82	Asp3	3.0	0.4	
	Glu4	1.1	0.0			Glu4	2.4				Glu4	2.3	0.6	
	Asp20	21.3				Asp20	4.1				Asp20	10.2	8.0	
	Glu21	20.6				Glu21	1.8				Glu21	13.8	0.1	
	Asp26	5.8				Asp26	0.0				Asp26	7.4	25.3	
	Glu34	4.0				Glu34	13.2				Glu34	4.8	6.4	8.8
	Asp39	10.7		4.9		Asp39	8.9		97.4		Asp39	9.5		
	Glu53	0.9	48.6			Glu53	3.4				Glu53	3.5	3.1	
	Glu57	0.0	10.6			Glu57	9.5		2.3		Glu57	2.6		
	Glu59	1.6	0.3			Glu59	10.8	0.2	85.8		Glu59	1.5	0.1	
	Glu78	0.1	0.0	0.4		Glu78	2.6				Glu78	8.4	25.6	81.8
	Glu90	52.5	54.2	7.7		Glu90	16.2	27.8	100.0		Glu90		3.8	
	Asp100	1.4		23.4		Asp100	3.1	5.5			Asp100	5.4		
	Asp102	3.4		25.3		Asp102	2.7	3.3			Asp102	11.1		
	C-terminal	2.0	3.3			C-terminal	2.6	0.3			C-terminal	3.4	11.9	
sum		126.4	116.9	61.7	sum		83.0	37.0	285.4	sum		86.8	85.3	90.7

(B)					(D)					(F)				
substituted residue	pair residue	450 K	400 K	300 K	substituted residue	pair residue	450 K	400 K	300 K	substituted residue	pair residue	450 K	400 K	300 K
Asp39	N-terminal	2.6	1.2		Lys72	Asp3	3.4	24.3			Glu4	0.8	0.0	
	Lys5	0.4	1.0			Glu4	6.9	32.8	0.7		Asp20	23.9	43.4	15.8
	Lys30	6.4	0.1			Asp20	0.9				Glu21	34.4	1.4	
	Lys35	10.7	2.6			Glu21	2.1				Asp26	6.5	0.5	
	Lys48	8.9		97.4		Asp26	0.5				Glu34	4.3		
	Lys55	3.1				Glu34	6.9	6.2			Asp39	5.4		
	Lys67	4.8	78.4	100.0		Asp39	4.9	0.1			Glu53	0.1	21.6	
	Lys72	4.9	0.1			Glu53	10.8				Glu57	4.9	34.2	30.8
	Lys81	6.6				Glu57	12.8				Glu59	9.4	0.0	41.3
	Lys82	9.5				Glu59	9.3				Glu78	3.6	40.3	
	Lys87	5.4				Glu78	3.0	1.3			Glu90	4.4	0.3	15.3
	Arg88	10.7		4.9		Glu90	0.0	0.0			Asp10	1.0		
	Arg112	0.8	10.8			Asp100	3.7	1.6			Asp102	2.5		0.9
	sum	74.8	94.1	202.3		Asp102	4.1	4.5			C-terminal	5.0		
sum		74.8	94.1	202.3	C-terminal		2.7	2.2	95.6	sum		107.9	141.7	104.1
					sum		72.1	73.1	96.3					

Table 2. Occupancy of ion pairs (less than 0.6 nm) for targeted residues of Ec0VV_6 at 450, 400 and 300 K during MD simulation (amber)

The unit is %. The values at 450 and 400 K were taken during 2000ns. Those at 300 K between 50 and 200ns.

(A)					(D)				
target res	pair res	450 K	400 K	300 K	target res	pair res	450 K	400 K	300 K
Arg88	Asp26	0.0			Lys72	Asp3	8.1	5.9	
	Glu53	5.1	5.9			Glu4	8.1	6.8	
	Glu57	5.7	5.7			Glu34	8.5		
	Glu59	6.8	9.7			Glu78	1.7		
	Glu78	0.1				Asp100	0.2		
	Glu90	55.9	37.0			Asp102	1.5		
	Asp102	0.2		99.6		C-terminal	3.3	5.1	54.0
	C-terminal	0.6	0.8		sum		31.5	17.8	54.0
sum		74.3	59.1	99.6					

(B)					(E)				
target res	pair res	450 K	400 K	300 K	target res	pair res	450 K	400 K	300 K
Asp39	Nterminal	7.6	3.9		Lys82	Asp3	0.9		
	Lys5	2.2	3.7			Glu4	1.1		
	Lys47			100.0		Asp26	0.3		
	Lys67	76.0	72.5	100.0		Glu34	6.1	1.6	
	His98	0.3	0.4			Glu53	0.1		
	Arg112	0.4	1.7			Glu78	34.6	39.6	36.8
sum						Glu90	1.7	0.3	
						Asp100	0.4		
						Asp102	0.1		
						C-terminal	0.3	0.1	
					sum		45.5	41.7	36.8
sum		86.6	82.1	200.0					

(C)					(F)				
target res	pair res	450 K	400 K	300 K	target res	pair res	450 K	400 K	300 K
Lys48	Asp3	0.2			Lys87	Asp3	0.6		
	Asp20	0.1				Glu4	0.5		
	Glu21	0.1				Asp20	0.3	0.3	
	Asp39			100.0		Glu34	1.9		
	Glu53	6.3	5.3			Glu53	3.4	1.8	
	Glu57	7.7	9.3			Glu57	7.6	9.0	
	Glu59	17.6	22.3			Glu59	20.4	18.9	
	Glu90	23.9	45.2	100.0		Glu78	0.5		
	Asp100	3.0				Glu90	0.8	2.5	
	Asp102	7.2				C-terminal	0.2	2.2	
	C-terminal	8.4	6.5		sum		36.2	34.7	0.0
sum		74.4	88.6	200.0					

平成 29 年度 利用研究成果リスト

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

Ion-ion interactions in the denatured state contribute to the stabilization of CutA1 proteins

Katsuhide Yutani, Yoshinori Matsuura, Hisashi Naitow, and Yasumasa Joti 学術雑誌に投稿中

【国際会議、学会などでの口頭発表】

油谷克英、松浦祥悟、内藤久志、城地保昌

「蛋白質の変性状態における荷電性残基の特徴：高温での MD simulation」

第 17 回日本蛋白質科学会年会、ポスター発表、2017 年 6 月、仙台国際センター