

課題名(タイトル):

## 電位依存性イオンチャネルの分子動力学シミュレーション

利用者氏名:

○近藤 寛子(1)

理研における所属研究室名:

(1) 生命機能科学研究センター 計算分子設計研究グループ

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

抗体は異物(抗原)に特異的に結合する機能を持ち、体内に侵入した細菌やウイルスの除去に関わることからワクチンとしても用いられる。PG16 はヒト免疫不全ウイルス(HIV)を中和する抗体の1つである。抗体の抗原結合部位は6つの相補性決定領域(CDR)からなり、その一つであるCDR-H3は配列、構造ともに最も多様性が大きい領域であるが、結晶構造からPG16は28残基の長いCDR-H3を持ち、抗原結合により大きな構造変化が起こらないことがわかった。PG16はCDRのアミノ酸変異に耐性を持つものの、CDR-H3のTrp<sup>H100A</sup>, Asp<sup>H100I</sup>, Tyr<sup>H100Q</sup>の変異では中和能が大きく低下することも明らかになっている。Trp<sup>H100A</sup>とAsp<sup>H100I</sup>は抗原結合部位付近に位置しているが、Tyr<sup>H100Q</sup>は抗原からは離れたところに位置しており、この残基の物理的役割は不明である。そこで本研究では、PG16の野生型(WT)およびのTyr<sup>H100Q</sup>のアラニン変異体(Y100qA)およびフェニルアラニン変異体(Y100qF)について分子動力学(MD)シミュレーションを行い、変異の影響を解析した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

WT, 変異体(Y100qA, Y100qF)ともに野生型の結晶構造(PDB ID: 4DQO)をもとに初期構造を作成し水と和させた。シミュレーションにはV<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>ドメインのみを用いた。ソフトウェアはGROMACSを用い、温度圧力一定(300 K, 1 bar)の条件で300 nsのシミュレーションを行った。タンパク質の力場としてAber ff99SB-ILDN, 水分子の力場としてSPC/Eを用いた。硫酸化チロシン(Tys)残基にはGAFFを用いた。シミュレーションは、初速度を変えて各系3本ずつ、計9本行った。20 ps毎にそれぞれ15,001個のスナップショットをサンプルし、解析を行った。各ドメインは以下のよう

に定義した: non-CDR-H3 V<sub>H</sub>ドメイン: 1<sup>~</sup>97, 126<sup>~</sup>137 番目の残基; CDR-H3: 98<sup>~</sup>125 番目の残基; V<sub>L</sub>ドメイン: 138<sup>~</sup>248 番目の残基。解析にはMDTrajライブラリを用いた。

3. 結果

まず、各シミュレーションにおけるタンパク質の安定性をみるためにnon-CDR-H3 V<sub>H</sub>ドメインでフィッティングを行った場合のnon-CDR-H3 V<sub>H</sub>ドメインおよびCDR-H3のRMSDを解析した。その結果、non-CDR-H3 V<sub>H</sub>ドメインはすべてのシミュレーションで1 Å前後と安定していたのに対し、CDR-H3はWTで4.86 ± 2.15 Å, 4.71 ± 1.88 Å, 4.06 ± 1.24 Å, Y100qFで6.10 ± 1.75 Å, 5.06 ± 1.22 Å, and 6.39 ± 1.61 Å, Y100qAで10.28 ± 2.35 Å, 5.71 ± 1.83 Å, and 4.43 ± 0.99 Åとなり、変異体でやや大きい傾向となった。特に、Y100qAでは3本中2本のシミュレーションでCDR-H3のRMSDの大きな変化が見られた。そこで、構造変化の詳細を調べるために主成分分析(PCA)を行った。すべてのトラジェクトリを纏めてnon-CDR-H3 V<sub>H</sub>ドメインでフィッティングを行った後、主鎖の重原子の座標に対してPCAを行った。PC1(寄与率: 32.9%)はCDR-H3がV<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>ドメインに対して折れ曲がるような運動となり、Y100qFではWTに比べてPC1方向にやや広がった分布が得られ、Y100qFでは二峰性の分布が得られた。このことからY100qAのシミュレーションではCDR-H3が大きく折れ曲がる構造転移が起きていることがわかった。また、この運動方向は、WTでも動きやすい方向であることがわかった。主鎖の二面角( $\phi$ ,  $\psi$ )の解析から、Y100qAでは(構造転移が見られなかった1本も含めて)すべてのシミュレーションでGly<sup>H97</sup>の二面角がWTに比べて大きく変化しており、 $\phi$ ,  $\psi$ ともに変化しやすい傾向にあることが示唆された。構造遷移が見

られた 2 本では、 $\psi$  に特に大きな変化が見られた。Gly<sup>H97</sup> は変異を入れた Tyr<sup>H100Q</sup> とともに疎水性コアを形成していると考えられている残基であり、Y100qA 変異体では、変異の影響により疎水性コアの相互作用が弱くなり、Gly<sup>H97</sup> の二面角が変化しやすくなったことにより構造転移が起こりやすくなることが示唆された。Y100qF 変異体では Tyr<sup>H100Q</sup> と Pro<sup>H99</sup> の間の水素結合は消失するが、疎水性相互作用が残るため、Y100qA に比べると構造転移は起こりにくくなっていると考えられる。

#### 4. まとめ

PG16 の中和能に関わるタンパク質の動的性質を明らかにするため、野生型および 2 種類の変異体 (Y100qF, Y100qA) のシミュレーションを行い、動態の違いを解析した。その結果、WT では Y100qA では 3 本中 2 本で CDR-H3 が大きく折れ曲がる構造遷移が見られた。PCA の結果から、この構造遷移の方向は WT でも動きやすい方向となっており、タンパク質がもともと持つ揺らぎが変異の影響により大きくなった可能性がある。Y100qF では変異を入れた Tyr<sup>H100Q</sup> と Pro<sup>H99</sup> の間の水素結合が消失する一方で Tyr<sup>H100Q</sup> が形成していた疎水性コアの相互作用は残るが、Y100qA 変異体では水素結合の消失とともにコアの相互作用も弱くなる。それにより Gly<sup>H97</sup> (疎水性コアの一部) の主鎖の二面角が動きやすくなり、構造変化が起きやすくなることが示唆された。

#### 5. 今後の計画・展望

本研究では V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> ドメインのみでシミュレーションを行ったが、今後は C<sub>H1</sub>, C<sub>L</sub> ドメインを含めた Fab 領域全体のシミュレーションを行い、C<sub>H1</sub>, C<sub>L</sub> ドメインの動態への影響を含めて解析を行いたいと考えている。また、PG16 と同様に高い HIV 中和能を持つ PG9 についてもシミュレーションを行い、PG16 の動態との比較を行いたい。

2019 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. “電位依存性カリウムチャンネル Kv1.2 の変異体における不活性化の分子機構の解析”  
近藤 寛子, 吉田 紀生, 城田 松之  
*アンサンブル* **21**, 283-289, October 2019
2. “Effects of a remote mutation from the contact paratope on the structure of CDR-H3 in the anti-HIV neutralizing antibody PG16”  
Hiroko X. Kondo, Ryo Kiribayashi, Daisuke Kuroda, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Kouhei Tsumoto, and Yu Takano  
*Scientific Reports* **9**:19840, December 2019

【口頭発表】

1. “Analysis of Effect of Mutation on the Response for Membrane Depolarization in the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.2”  
○Hiroko X. Kondo, Norio Yoshida, Gen Masumoto, Matsuyuki Shirota, Yu Takano, Kengo Kinoshita  
第 57 回日本生物物理学会年会 シンポジウム「タンパク質のダイナミックレスポンスに関わる未解決問題への挑戦」, 宮崎, 2019 年 9 月 25 日