

課題名(タイトル):分子シミュレーションによる新規タンパク質および基質の開発

利用者氏名:

○楊正博

理研における所属研究室名:

脳神経科学研究センター 細胞機能探索技術研究チーム

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

特定の機能を持ったタンパク質を改変する事で、基礎研究や医療現場で活用できるタンパク質を作製できる。現在はタンパク質にランダムもしくは経験測に基づいてアミノ酸変異を導入する手法が主流なため、効率が悪く成功する見込みなども予測できない。

利用者は、タンパク質にアミノ酸変異を導入した場合の分子特性の予測計算に挑戦してきた。励起エネルギーの予測はQM/MM計算では実用レベルの予測精度に至っていない。一方、基質親和性に関してはMD計算によるKm値の実用レベルの予測精度を達成し、実際に蛍光タンパク質や酵素の改変に成功している。しかし、1変異体の計算にBW-MPCで6000コア時間以上が必要なため、基質との結合に重要なアミノ酸を目視で判断してから、計算する変異体を絞り込んでいる。

本課題ではフラグメント軌道(FMO)計算により、励起エネルギーおよび酵素活性に重要なアミノ酸を予測できるか検証する。

2. 具体的な利用内容、計算方法

利用者の研究室で改変中の蛍光タンパク質 U,I,G および酵素 Y に関して、FMO 計算により励起エネルギー計算およびフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)を解析する。FMO 計算はGAMESS および ABINIT-MP で行う。ABINIT-MP は立教大学理学部望月祐志教授らが開発した ABINIT-MP Open Ver. 1 を使用させて頂いた。

(Electron-correlated fragment-molecular-orbital calculations for biomolecular and nano systems”, S. Tanaka, Y. Mochizuki, Y. Komeiji, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 10310-10344.)

PDB データベースより取得したタンパク質の立体構造を FMO-MP2 計算により構造最適化したのち、

①CIS 法による励起エネルギー計算

②IFIE 解析による重要アミノ酸の予測

を行う。解析結果から重要アミノ酸をアラニンで置換した場

合の励起波長および基質親和性の変化を実験で確認することで、計算結果の検証も行う。

3. 結果

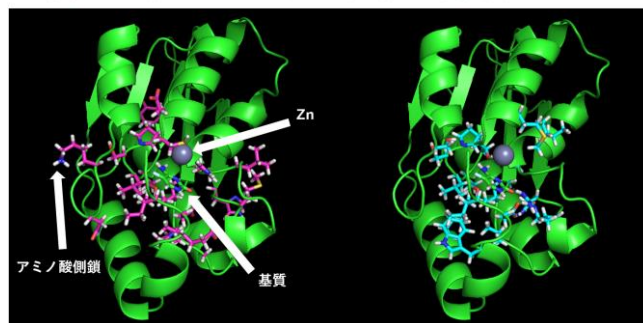
①今回設定した計算条件では蛍光タンパク質 U,I,G の励起エネルギーを再現できなかった。そのため、アラニン置換実験は行わなかった。

②IFIE 解析は ABINIT-MP と GAMESS で同条件で同等の結果になることを確認した。ABINIT-MP の方が計算速度が速く、入力ファイルの準備も簡易なため、ABINIT-MP を使用した。

酵素 Y に関して、HF, MP2, MP2D, MP3 レベルで IFIE 解析を行った。どのレベルの計算でも基質と IFIE が認められたアミノ酸に違いはなかった。それらアミノ酸をアラニンで置換したタンパク変異体をそれぞれ作製し、基質親和性(Km 値)を測定した。側鎖が基質方向のアミノ酸も目視で選定して、同様にアラニンで置換して Km 値を測定した。

実験の結果、基質との IFIE が認められたアミノ酸のほとんどで失活しており、酵素活性に重要なアミノ酸を予測できると思われる。特に側鎖が基質に向いていないアミノ酸は、目視による選定の際に実験対象から外れるため、それらアミノ酸を予測できることは実験する人間にとって重要である。

基質とIFIE有りのアミノ酸 側鎖が基質方向のアミノ酸



アラニン置換した場合の基質親和性の変化

アミノ酸番号	HF-IFIE	MP2-IFIE	MP2D-IFIE	MP3-IFIE	側鎖の向き	基質親和性(logKm)
30	-0.00018	-0.00019	-0.00017	-0.00015	外向き	失活
31	-0.00015	-0.00014	-0.0001	-0.0001	基質方向	-3.34836102
32	-0.00761	-0.00743	-0.00612	-0.00622	外向き	失活
33	-0.0002	-0.00017	-0.00011	-0.00014	基質方向	-2.912417415
34	0	0	0	0	基質方向	失活
50	-0.00231	-0.00222	-0.00184	-0.00177	外向き	失活
51	0.000062	0.000056	0.000083	0.000026	基質方向	失活
52	-0.00085	-0.00081	-0.00069	-0.00069	外向き	失活
53	0	0	0	0	基質方向	失活
61	-0.00913	-0.00863	-0.00737	-0.00646	外向き	失活
62	-0.00105	-0.001	-0.00086	-0.00079	外向き	失活
63	-0.00241	-0.00231	-0.00197	-0.00184	基質方向	-3.610590989
65	0	0	0	0	基質方向	失活
85	-0.00042	-0.0004	-0.00034	-0.00037	外向き	-3.507133676
86	0	0	0	0	基質方向	失活
87	-0.00334	-0.00323	-0.0027	-0.00272	基質方向	失活
88	-0.00085	-0.00081	-0.00067	-0.00068	基質方向	-3.716803977
89	-0.00419	-0.00411	-0.00324	-0.0036	基質方向	失活
90	-0.0013	-0.00128	-0.00099	-0.00104	基質方向	失活
91	-0.00011	-0.00011	-8.6E-05	-9.3E-05	外向き	失活
92	0	0	0	0	基質方向	-3.7
93	0	0	0	0	基質方向	失活
113	-0.00154	-0.00149	-0.00125	-0.00118	外向き	失活
114	0	0	0	0	基質方向	失活
115	-8.5E-05	-8.1E-05	-5.8E-05	-7.4E-05	外向き	失活
116	0	0	0	0	基質方向	-3.368176427
141	0	0	0	0	基質方向	-3.293681267
152	0	0	0	0	基質方向	失活
154	-0.00721	-0.00692	-0.00584	-0.00577	外向き	失活
155	-0.00513	-0.00499	-0.00404	-0.00446	基質方向	失活
156	-0.00031	-0.00032	-0.00023	-0.0003	基質方向	失活

4. まとめ

タンパク変異体の分子特性予測に FMO 計算が活用できないか検証した。蛍光タンパク質の励起エネルギー計算は実験値の再現に至らなかった。

酵素活性に重要なアミノ酸の予測に関しては IFIE 解析が活用できることを検証実験で確認した。FMO 計算を活用することで、経験則による選定では見落としていた重要アミノ酸を見つけることが可能である。

5. 今後の計画・展望

本年度は野生型タンパク質の立体構造でのみ FMO 計算を行った。今後は in silico でアミノ酸変異を導入した場合の FMO 法による IFIE 解析および自由エネルギー計算を行う。FMO による構造最適化は約 100 アミノ酸のタンパク質でも BW-MPC で 10,000 コア時間以上必要だったため、変異体の立体構造予測には QM/MM による構造最適化、または MD トラジェクトリの利用などを検証する予定である。