

プロジェクト名(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. 本プロジェクトの研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

ヘムタンパク質はヘムを補因子にもつタンパク質の総称であり、酸素運搬や酸化還元反応触媒、シグナル伝達など様々な生体機能を担っている。活性中心であるヘムには複数の種類があるが、ポルフィリン環に鉄イオンが配位した基本骨格はほぼ共通している。つまり、ヘムは同一の基本骨格を持つにもかかわらず、複合体を形成するタンパク質により異なる機能を発現する。ヘムの機能制御メカニズムは未解明であり、重要な課題である。これまでの研究から、ヘムの軸配位子やプロピオン酸の配向に加え、ヘムの歪みがヘムの物性やタンパク質機能に関与していることが示されている。そこで本研究では、ヘムの歪みに対するタンパク質ポケットの影響を調べることを目的として、ヘモグロビンとミオグロビンを対象にタンパク質ポケットおよびヘムの動態を分子動力学(MD)シミュレーションにより解析した。申請時の研究テーマとは異なっているが、今年度はイオンチャネルに関する研究の進展がほとんどなかったため、このテーマについて報告する。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

ヘモグロビン、ミオグロビンのそれぞれについて、酸素結合状態、酸素非結合状態、アポタンパク質(ヘム非結合状態)のシミュレーションを行った。酸素結合状態および非結合状態の構造をPDBから取得し、シミュレーションの初期構造とした(ヘモグロビンについては、それぞれ 1AN3; human, 解像度 1.8 Å, 2DN1; human, 解像度 1.25 Å, ミオグロビンについては、それぞれ 1MBD; sperm whale, 解像度 1.4 Å, 1MBO; sperm whale, 解像度 1.6 Å)。アポタンパク質については、酸素非結合状態の X 線構造からヘムを除くことで作成した。アミノ酸側鎖のプロトン化状態は、H++ server

(<http://newbiophysics.cs.vt.edu/H++/>)により得られた結果を参考に決定した。シミュレーションボックスのサイズは、タンパク質とボックスの距離が 10 Å となるように決め、周期境界条件を適用した。溶媒は 150 mM の NaCl 溶液とした。力場としては、アミノ酸残基およびイオンには Amber ff14SB 力場、水分子には TIP3P モデルを用い、ヘムには Bringas らの力場を用いた。それぞれの系について、200 ns のシミュレーションを 2 本ずつ実行した。MD シミュレーションには GROMACS 2019.5 を使用した。ミオグロビンのシミュレーションでは、ヘムと軸配位子のヒスチジンの間の相互作用が維持されなかったため、両者の間に距離高速をかけた。リファレンス距離は、X 線構造における配位距離とした。

## 3. 結果

まず、PDB に登録されている構造を対象にヘモグロビンとミオグロビンにおけるヘムの歪みの分布を比較した。その結果、ヘモグロビンに結合しているヘムは、ミオグロビンに比べて Doming 方向の歪み(酸素親和性に相関することが知られている)が大きく、酸素結合状態と非結合状態における歪みの差も大きい傾向があることがわかった。

続いて、MD シミュレーションによりヘム結合部位の動態およびヘムの分子構造の揺らぎを解析した。アポタンパク質では、ホロタンパク質に比べてややポケットの構造揺らぎが大きくなり、ヘモグロビンよりもミオグロビンの方が構造揺らぎが大きいという結果が得られた。アポタンパク質におけるポケットの構造変化としては、初期構造に対する Root mean square deviation (RMSD) の平均値が 0.54 から 2.0 Å となり、比較的安定していた。シミュレーションにおけるヘムの分子構造の揺らぎを解析した結果、ヘモグロビンではミオグロビンに比べて酸素結合状態の Doming

歪みが大きい傾向が見られた。

さらに、MD シミュレーションの結果からヘム結合部位のクラスタリングを行い、代表構造について ONIOM 計算による構造最適化を行い、ヘムの歪みを評価した。ヘモグロビンでは、特に酸素結合状態における Doming 歪みがミオグロビンに比べて大きくなり、酸素結合状態と非結合状態での歪みの大きさの差が大きい傾向が見られた。この結果は、MD シミュレーションおよび PDB 構造の解析結果と一致している。このことは、古典シミュレーションでもヘムの分子構造の揺らぎが再現できるということを示唆している。本研究で得られた結果は、ヘム結合部位のタンパク質環境がヘムの分子構造を制御することでタンパク質に固有の機能を発現していることを示唆している。

#### 4. まとめ

ヘモグロビンおよびミオグロビンを対象として、ヘム結合部位およびヘムの構造揺らぎを MD シミュレーションおよび量子化学計算を用いて解析した。ヘムの分子構造については、酸素親和性に相關することが知られている Doming 歪みに着目して解析を行った。ホロタンパク質の酸素結合状態、酸素非結合状態に加えてアポタンパク質のシミュレーションを行い、ヘム結合部位の頑健性を示すとともに、酸素結合状態と酸素非結合状態のヘモグロビンおよびミオグロビンにおけるヘムの歪みの分布の違いを明らかにした。この結果は、ヘム結合部位のタンパク質環境がヘムの分子構造を制御することでタンパク質に固有の機能を発現していることを示唆している。

#### 5. 今後の計画・展望

本研究では酸素運搬・貯蔵タンパク質であるヘモグロビンとミオグロビンを対象に解析を行ったが、ヘムタンパク質は多様な生命機能を担っているため、さらに解析対象を広げ、タンパク質機能ごとの動的な特性を明らかにしたい。

2021 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. "Global analysis of heme proteins elucidates the correlation between heme distortion and the heme-binding pocket"  
Hiroko X. Kondo\*, Masanori Fujii, Takuma Tanioka, Yusuke Kanematsu, Takashi Yoshida, and Yu Takano  
*The Journal of Chemical Information and Modeling* **62**, 775-784, 2022
2. "Analysis of fluctuation in the heme-binding pocket and heme distortion in hemoglobin and myoglobin,"  
H. X. Kondo\* and Y. Takano  
*Life* **12** (2), 210, 2022

【口頭発表】

1. "ヘムタンパク質における構造機能相関の解明に向けた構造データの網羅解析",  
○近藤 寛子  
生物工学会北日本支部シンポジウム, オンライン開催, 2021 年 8 月
2. "ヘム蛋白質における構造機能相関の解明に向けた蛋白質ポケットとヘムの歪みの相関解析",  
○近藤 寛子, 飯塚 博幸, 舩本 現, 兼松 佑典, 鷹野 優  
第 21 回日本蛋白質科学会, オンライン開催, 2021 年 6 月

【ポスター発表】

1. 「ヘム蛋白質における構造機能相関の解明に向けたヘム結合部位のタンパク質環境とヘムの歪みの相関解析」  
○近藤寛子, 飯塚博幸, 舩本現, 兼松佑典, 鷹野優  
日本コンピュータ化学会 2021 秋季年会, オンライン, 1P08, 2021 年 11 月 2 日