

タンパク質の長時間シミュレーションにおいて 観測された結晶構造の不安定性

(横浜市大院・生命ナノシステム¹, 理研・次世代計算科学²)

○ 瀧上 壮太郎¹, 成富 佑輔¹, 池口 満徳¹, 木寺 詔紀^{1, 2}

【序】タンパク質の分子動力学シミュレーションでは、初期構造として、X線結晶構造解析で決定された結晶構造を利用する 경우가ほとんどである。その前提として、結晶構造が溶液中においても安定であることを仮定している。しかし、この仮定が常に正しいとは限らない。本研究では、リジン/アルギニン/オルニチン結合タンパク質(LAO)を対象として、300 nsの長時間分子動力学シミュレーションを実行したところ、結晶構造からの構造緩和が観察された。また、結晶構造の安定性に寄与すると考えられるアミノ酸残基について、その突然変異体(Y14A)を作成し、シミュレーションによって構造の安定性を調べた。

【分子動力学シミュレーション】基質が結合していないLAOの結晶構造(PDB ID: 2LAO, 図1)を用い、野生型と変異型(Y14A)の水を陽に含んだ全原子分子動力学シミュレーションを行った。系の総原子数は約8万である。シミュレーションの実行にはM. Ikeguchiにより開発された高精度・高効率な分子動力学シミュレーションソフトウェアMARBLEを使用し、力場はCHARMM22/CMAPを用いた。系に周期境界条件を課し、静電相互作用の計算にはParticle Mesh Ewald(PME)法を用いた。作成した初期構造をエネルギー最小化し、等温等圧(NPT)アンサンブルを用いた平衡化を行った後、ミクロカノニカル(NVE)アンサンブルで本計算を、野生型は300 nsを2回、変異型は50 nsを2回実行した。すべての計算において時間刻みは2 fsとした。

【結晶構造の構造緩和】野生型のシミュレーション結果について、結晶構造からのRMSDの時間発展を図2に示す。この図より、2回のシミュレーションのいずれにおいてもLAOの構造が結晶構造から有意に

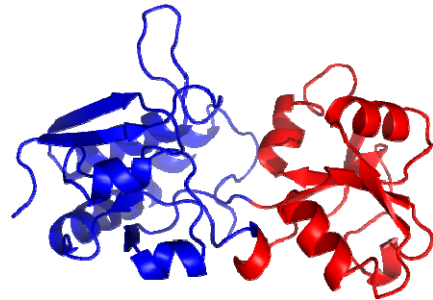


図1: リジン/アルギニン/オルニチン結合タンパク質の立体構造。2つのドメイン(青, 赤)から成る。

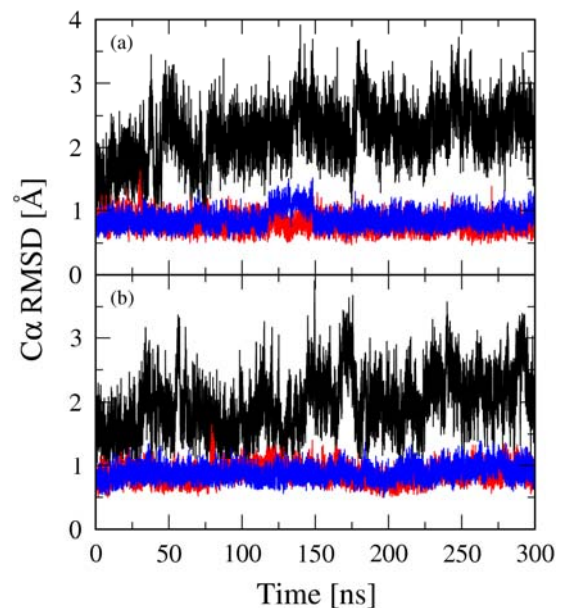


図2: 結晶構造とのRMSDの時間発展。野生型1本目(a)・2本目(b)。全体:黒, 各ドメイン:青, 赤。

変化したことがわかる。一方、LAO の2つのドメインの RMSD は十分に小さく留まっており、ドメインの構造は安定であることがわかる。つまり、全体を用いた RMSD の時間発展に見られる構造緩和はドメイン運動に依ると考えられる。300 ns のシミュレーションのうち最後の 100 ns を平衡状態と見なして平衡構造を求め、結晶構造と比較したところ、ドメインのねじれ運動が構造緩和の主因であることがわかった。また、LAO は 100 ns 以内に平衡状態に到達したと考えられる。平衡状態への緩和が観察されたことは、LAO の結晶構造が溶液中では不安定であり、平衡構造と異なることを意味する。しかし、その真偽は実験によって確認する必要がある。

【結晶構造の安定化要因】シミュレーションの結果から LAO の結晶構造は溶液中で最も安定な構造ではないことが示唆されたが、実際には結晶構造も一定の割合で存在するはずである。結晶構造のドメイン境界部分を観察すると、ドメイン間のクレフト内に両ドメインのアミノ酸残基と水分子とで水素結合ネットワークが形成されていることがわかる(図3)。とくに、14 番目のチロシンはネットワークの端に位置し、ドメイン間クレフトが閉まらないようにする「つかえ棒」のように見える。実際、リガンド結合時には構造の変化に伴い側鎖のロータマーも変化していること、また、野生型のシミュレーションではロータマーの変化が観察されたことから、このチロシン残基が結晶構造の安定化に寄与しているのではないかと予想される。

そこで、このチロシンをアラニンに置換した変異体(Y14A)を作成し、シミュレーションを 2 回行った。結晶構造からの構造緩和を記述する座標として、野生型の平衡揺らぎの第 2 主成分(PC2)を用いたときのシミュレーション結果を図4に示す。野生型のシミュレーション(図4(a,b))では、50 ns 以内に点線で示した平衡構造まで十分に緩和しきっていないことがわかる。一方、変異型のシミュレーション(図4(c,d))では、50 ns 以内に平衡構造まで緩和しているのが見て取れる。以上より、14 番目のチロシンは結晶構造からの構造緩和を阻害している、つまり、結晶構造を安定化する役割を担っている、と考えられる。

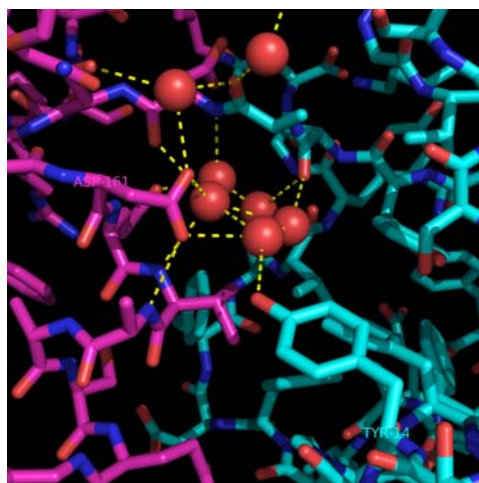


図3: LAO の結晶構造で観察されるドメイン間クレフト内の水素結合ネットワーク。赤玉:水分子。

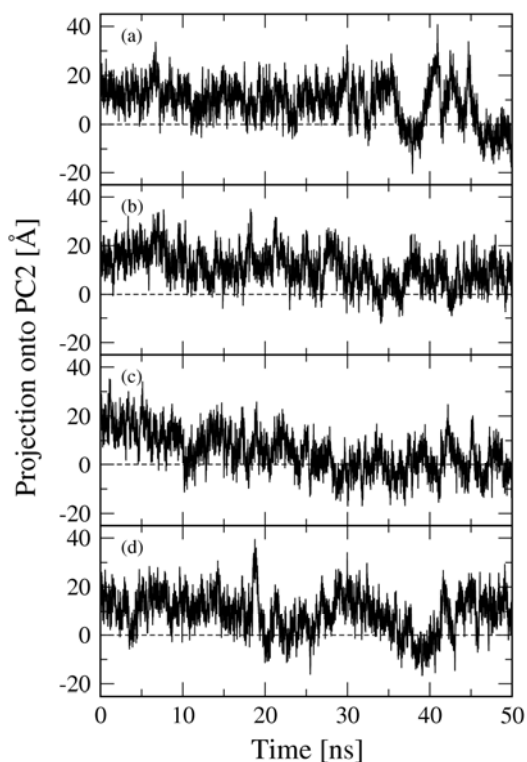


図4: PC2 へ射影したトラジェクトリ: 野生型 1 本目(a)・2 本目(b), 変異型 1 本目(c)・2 本目(d).