

3P085

イヌミルクリゾチームのアンフォールディング経路についての

理論的研究：ヤギ α ラクトアルブミンとの比較

(分子研・理論計算¹, 横浜市大・国際総合², 統合バイオ³) ○小林千草¹, 笠口友隆²,
池口満徳², 中村敬³, 真壁幸樹³, 桑島邦博³, 齊藤真司¹

[序]

イヌミルクリゾチーム(CML)とヤギ α ラクトアルブミン(GLA)はC-type リゾチーム/ α -ラクトアルブミンファミリーに属するタンパク質である。二つのタンパク質間の配列相同性は41%あり、天然状態では非常に近い構造を持つ。(図1) また、これらのタンパク質はどちらもアンフォールディング過程において Molten globule (MG) 状態を中間状態として取ることが知られている。しかし、近年の実験研究から CML と GLA では MG 状態の安定性や構造が異なることが明らかになって

きた。CML の MG 状態は安定性が高く、特に α ドメインが安定しているが、その一方でカルシウム結合部位の安定性が低いことが示されている。他方では、GLA の MG 状態における α ドメインの安定性は低い。このように高い配列相同性と似ている構造を持ちながら、異なるアンフォールディング経路を

持つようなタンパク質において、経路の違いを研究することは、タンパク質のアンフォールディング過程を理解する上で非常に重要である。

本研究の目的は、高い相同性を持つタンパク質におけるアンフォールディング過程の違いの由来を明らかにすることである。全原子モデルを用いた分子動力学法によるアンフォールディング計算を CML に対して行い、アンフォールディングの経路や、CML 内の二つのドメイン(α 、 β ドメイン)の安定性について解析を行った。

[方法]

分子動力学計算の初期構造は、CML の結晶構造を用いた。分子動力学計算には Gromacs 4 を使い、全原子モデル(charmm22)による計算を行った。

まず、298.15K での計算を行い、天然状態での構造やその揺らぎについて解析を行った。その後、298.15K から 398.15K、450.15K、498.15K へとそれぞれ温度を上げ、タンパク質を変性

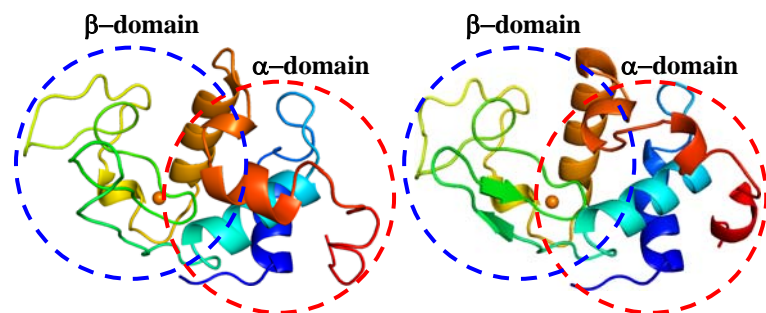


図 1: イヌミルクリゾチーム (左) とヤギ α ラクトアルブミン (右) の天然状態の構造

させ、アンフォールディング過程における構造やコンタクトの変化などについて調べた。

[結果と考察]

まず、天然状態(298.15K)における CML について述べる。平均二乗揺らぎ、主成分解析の結果より、CML の構造揺らぎは β ドメイン内の β シートでは大きく、一方で、 α ドメイン内の 4 本の α ヘリックスでは小さいことがわかった。つまり、天然状態では α ドメインは β ドメインより安定である。

次にアンフォールディング計算について述べる。すべての温度(398.15K、450.15K、498.15K)で、アンフォールディングは β ドメイン内での β シートより開始していることが分かった。

(図 2) また、カルシウム結合部位と β シートとの間のコンタクトもアンフォールディングしていることもあわせて示した。一方、 α ドメイン内のヘリックス間の部位(A-C, B-D)では β シートと比べて、コンタクトを保っていることが明らかとなった。ヘリックス間の部位(A-B-C, B-D)のコンタクトは主に側鎖同士の疎水性相互作用からなるものである。これらの結果は、実験研究で報告された MG 状態での α ドメインの安定性に対応すると考えられる。本研究から、 α ドメインの安定性には、ヘリックス間の部位(A-C, B-D)のコンタクトが重要な役割を持つことが示された。

また、すでに報告されている GLA のアンフォールディング過程^{1,2}との比較も行った。

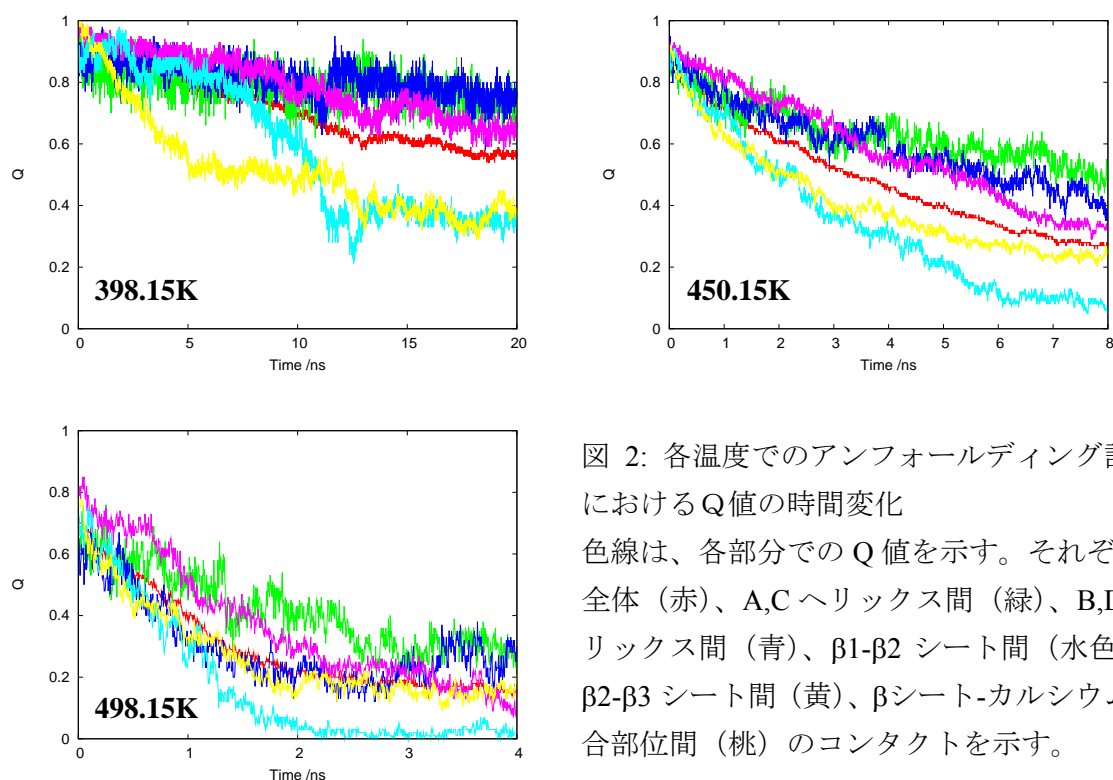


図 2: 各温度でのアンフォールディング計算における Q 値の時間変化

色線は、各部分での Q 値を示す。それぞれ、全体 (赤)、A,C ヘリックス間 (緑)、B,D ヘリックス間 (青)、 β 1- β 2 シート間 (水色)、 β 2- β 3 シート間 (黄)、 β シート-カルシウム結合部位間 (桃) のコンタクトを示す。

T. Oroguchi *et al.*, *J Mol Biol* **371**, pp 1354-1364 (2007).

T. Oroguchi *et al.*, *J Mol Biol* **354**, pp 164-172 (2005).