

# 高圧力下における DHFR の構造動態

(高圧蛋白・近大, JST-CREST)○米澤 康滋

## Simulation Study on the Dynamics of DHFR under High Pressure

(Kindai, JST-CREST)○Y.Yonezawa

### (序)

Dihydrofolate reductase (DHFR)はこれまでに様々な理論・実験的な研究が数多く行われているモデル酵素で、NADPH を補酵素としてジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元することで生体においてチミンの生成過程における基質を提供する。さらにその機能との関係から DHFR はその酵素機能から制ガン剤の標的蛋白質であると考えられ創薬などの応用面からも研究が進められている。加えてこれまでに DHFR の熱力学的研究も大変数多くなされており、構造と機能に関する熱力学的特徴が詳細に報告されている。このような背景のもと、我々はジヒドロ葉酸還元酵素を研究対象として高圧力下における深海生物蛋白質の進化を明らかにする研究を展開している。

様々な種に存在する DHFR の中で、深海生物 *Moritella profunda* の DHFR (mpDHFR:163 アミノ残基)について、分子動力学シミュレーションによる計算科学研究を常温及び高圧力下で実施し、これとの比較の為に *Escherichia coli* の DHFR (ecDHFR:159 アミノ酸残基)の分子動力学シミュレーションによる計算科学研究を実施している。DHFR の触媒過程においては 10 番目から 24 番目のアミノ酸残基で構成される M20-loop 構造が close 状態から open 状態及び occluded 状態と、構造を遷移することで触媒機能を果たすと報告されている。DHFR は他の酵素と比べても高いゆらぎを示す酵素であることが併せて報告されていることから、DHFR は蛋白質構造揺らぎダイナミックスの典型的な研究対象でもある。分子シミュレーション計算の解析から、深海生物 *Moritella profunda* の DHFR は *Escherichia Coli* の DHFR と構造揺らぎが本質的に異なる振る舞いをする結果が示唆された。その効果はこれまでに指摘されてこなかった E ヘリックスの大きな揺らぎの寄与であると推測できる。これらの結果から我々は深海生物 *Moritella profunda* の DHFR は高圧力下でその機能を発揮するために独自の進化を動的な側面において遂げていると考えている。

### (計算方法)

本計算科学研究では、DHFR に結合したリガンド分子による効果無くすために、PDB 構造から、結合小分子を取り除いた apo 型-DHFR を用いた。DHFR の初期構造データとして、大腸菌由来 DHFR の X 線構造解析構造、PDB-ID 1RX2 と深海生物由来 DHFR の 2ZZA を用いている。

この apo 型 DHFR を分子シミュレーション座標系の中心に配置して周りを予め平衡化した立方体の水分子モデル TIP3P に浸して、vdW 半径を目安として重なる水分子を排除して系を水和した。さらに系の水分子を適切な数の塩素イオンとナトリウムイオンを交換して生理的イオン濃度(150mM)にした。

Amber03 力場パラメータを蛋白質の古典的力場として用いた。図 1 に 1RX2 の立体構造を示す。

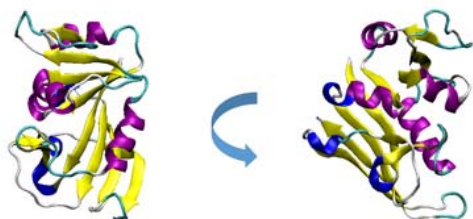


図 1

本シミュレーション計算に用いた ecDHFR (PDB-ID:1RX2) の構造。蛋白質をリボンモデルで描画し、2 次構造の内ヘリックス構造は紫色、シート構造は黄色で色分けして描画した。右は左を z 軸に対して 90 度反時計回回転させたもの。

この系を周期的境界条件に置き、蛋白質表面から各周期的境界への距離は  $12\text{\AA}$  以上となるように設定した。SHAKE 法を水素原子が関わる化学結合に適用してその化学結合長と化学結合角を固定し、時間刻み幅を 2fs とした。Particle Mesh Ewald (PME) 法を長距離静電相互作用に用いた。PME 法の実空間の相互作用カットオフ半径は  $8\text{\AA}$  に設定した。PME 法のグリッドサイズは、 $1.2\text{\AA}$  として Ewald 法からの誤差をシミュレーション解析でも支障がない程度に十分小さくした。分子動力学シミュレーションの運動方程式積分は Leap-Frog 法を使用した。初期設定の系に存在する近接しすぎた原子間の高いコンタクトエネルギーの緩和のために 1000 ステップのエネルギー最小化シミュレーションを実行した。最小化実行後に系を 310K に昇温し定温分子動力学シミュレーション (NVT) で平衡化した。その後定温定圧 (NPT:1 気圧) 条件化で 1ns シミュレーションして系をさらに平衡化させた。Nose-Hoover 法を温度コントロール法として用い、Parrinello-Rahmann 法を定温定圧のコントロールに用いた。平衡化された系からデータ取得をするためのシミュレーションを 50ns 実行し、トラジェクトリデータを、10ps 毎解析用に保存している。同じ系に対して、2000 気圧のシミュレーションを圧力以外は同じ条件で実施してトラジェクトリデータを取得した。

## (結果)

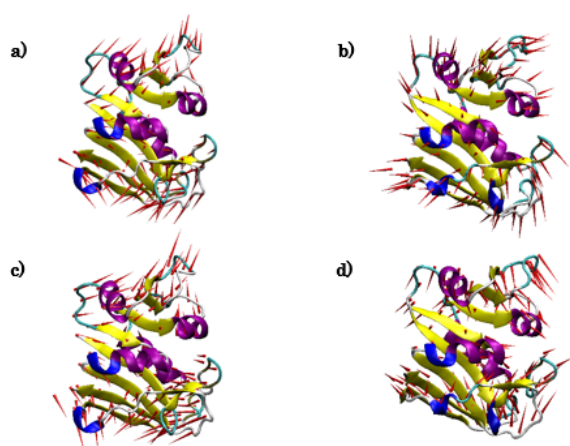


図 2 に 1 気圧及び 2000 気圧のデータを PCA 解析して得られた第一成分ベクトルを ecDHFR 及び mpDHFR 構造に投影した図を示す。この図から、ecDHFR の主要な揺らぎは 1 気圧の場合と 2000 気圧の場合とでよく似ている振る舞いをしていくことが明らかである。一方、1 気圧の状態では ecDHFR と mpDHFR の主要な揺らぎはたいへん異なっていることが分かる。さらに mpDHFR の 1 気圧と 2000 気圧の主要な揺らぎは大きく変化している事が分かる。発表時に結果と考察を詳しく解説し議論する予定である。

図 2 ecDHFR、a) 1 気圧、c) 2000 気圧、及び mpDHFR の、b) 1 気圧、d) 2000 気圧の第 1PCA 固有ベクトル