

【目的】

エクトインは、好塩性細菌が、外部浸透圧に対抗するために細胞内に蓄積する補償溶質の代表である環状アミノ酸であり、水溶液中では双性イオンとして存在する[1,2](図 1)。補償溶質はタンパク質に直接作用せず、溶質周囲の水分子の性質を変化させることで、熱や塩からタンパク質の立体構造を保護すると考えられている[3-7]。本研究は、未だ不明な点の多いその作用機構を分子動力学法を用い、分子レベルで解析した。

【方法】

全ての分子力学、分子動力学計算は AMBER 7 を用いて行った。(系内の分子力場関数は AMBER の param99 を使用した。)エクトインモノマーの初期構造(ECA)と、部分電荷は当グループで以前に行った、量子化学計算による値[8]を採用した。モデルタンパク質として、キモトリプシンインヒビター 2 (CI2) を用い、均一に分散したエクトイン 119 個と水分子 4002 個の周期的境界条件による溶媒ボックスに溶質を浸した系でのシミュレーション (MD1) を行った。さらに、補償溶質の影響を比較分析するために、CI2 が水分子のみに取り囲まれた系によるシミュレーション(MD2)も行った。水分子のモデルには TIP3P を使用し、MD1 と MD2 共に、時間刻み幅 2fs の分子動力学計算を繰り返し、それぞれ 1ns のシミュレーションを行った。本研究では、これらタンパク質を含んだシミュレーションに加え、エクトインの濃度が水分子の動的性質に与える影響を考察するために、二つの異なる濃度のエクトイン-水二成分系を作成し、同じく分子動力学シミュレーション (MD3 と MD4) を行った。さらに MD3 において、系内のエクトインの部分電荷を全て 0.0 に設定し、同様のシミュレーション (MD5) を行うことで、分子間静電相互作用が及ぼす影響を考察した。本研究では補償溶質が、熱からタンパク質立体構造を保護するメカニズムを考察するために、全てのシミュレーション(MD1~MD5)において、系内の温度は 370K に設定した。計算によって得られた各時刻の座標ファイルから、溶質や溶媒分子のダイナミクスを解析した。

【結果と考察】

水分子の拡散係数

本研究の解析によって明らかになったエクトイン添加による最も顕著な作用は、水分子の拡散係数の低下であった。表 1 に、MD1~MD5 における分子数と、系内の水分子の平均拡散係数 D を示した。エクトインが多い系では、より水分子の拡散が遅くなっていたが、エクトインの電荷を 0.0 にした場合(MD5)、水分子の拡散係数の低下は MD4 より小さかった。これらの結果から、水分子の拡散速度低下の主な要因として、水素結合によって、拡散の遅いエクトインの周りに水分子が捕らえられている可能性が示された。

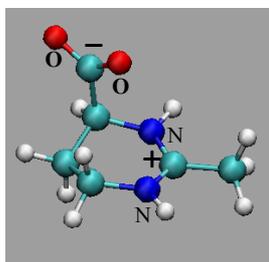


図1 エクトインの立体構造

表1 各シミュレーションにおける分子数と、系内の水分子の平均拡散係数

系	D ($10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$)
MD1 (CI2 1 : water 4002 : ECA 119)	9.62
MD2 (CI2 1 : water 5783)	11.93
MD3 (water 984 : ECA 64)	6.96
MD4 (water 1009 : ECA 1)	12.79
MD5 (water 984 : ECA (no charge) 64)	9.73

タンパク質近傍の水分子の動的挙動

エクトインが CI2 近傍の水分子に与える影響を考察するために、CI2 主鎖のアミドプロトンに配位している水分子(図 2)に注目し、配位数や動的挙動の解析を行った。図 3(b)と(d)に、MD1 と MD2 それぞれの CI2 主鎖のアミドプロトン第一溶媒和殻内に存在していた水分子をシミュレーション中の $t=100\text{ps}$ から 800ps まで 25ps 毎にピックアップし、それら水分子の 150ps 後までの二乗変位を平均した値 (平均二乗

変位:MSD)を示した。解析の結果、エクトイン存在下ではアミドプロトンに配位していた水分子の拡散が、その系全体での水分子の平均値(図3 (a)と(c)より、大幅に低下しており、補償溶質の影響が、蛋白質表面で特に強く示されていることが明らかになった。図3 (b)と(d)の最初の50psにおけるMSDから算出したこれら水分子の拡散係数を表2 D に示した。

上述の解析に加えて、水分子の水和構造を考察するために、C12 主鎖のアミドプロトンの第一溶媒和殻中に存在する水分子の配位数 n を計算した。MD1 と MD2 において、それぞれ平均 16.2 個と 18.9 個(表 2 n1) が C12 主鎖のアミドプロトンに配位しており、エクトイン存在下でも水和数に大きな差異が無いことから、補償溶質が直接蛋白質に作用していないことがシミュレーションにおいても確認出来た。これらの結果から、蛋白質表面と <エクトイン+水> の層にはさまれた水分子の層が、より安定的かつ強固に水和の層を形成している可能性が示された。このような作用を裏付けるように、MD1 では、平均して 5.0 個 (31%) の水分子が 25ps 経過後も同じアミドプロトンの第一溶媒和殻内に留まっている事が判明した。一方、MD2 では 2.1(11%)個となり、エクトイン存在下では第一溶媒和殻内での水分子滞在時間が増加する事が明らかになった(表 2 n2)。

【結論】

本研究のシミュレーションにおいて、補償溶質がタンパク質近傍の水分子の拡散を、大きく低下させる事が明らかになった。FoordらはNMRを用いた実験的解析によって、同じく双性イオン補償溶質であるグリシン存在下では、C12 主鎖のアミドプロトンの重水素交換反応速度 (deuterium exchange rate) が大きく低下する事を示した[5]。重水素交換反応は、タンパク質の各残基における局所的な揺らぎや、アミドプロトン周囲の水分子の拡散などが複雑に影響を及ぼしており、さらなる詳細な解析が必要とされるが、本研究で明らかになった、補償溶質によるタンパク質近傍の水分子拡散の低下は重水素交換反応速度の低下や、タンパク質立体構造の安定化をもたらす重要な要因であると考えられる。

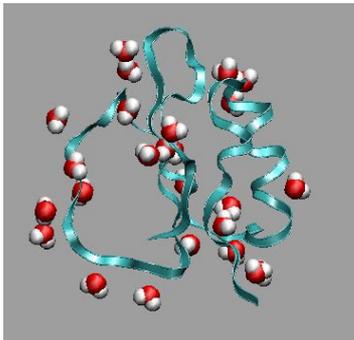


図2 C12主鎖のアミドプロトンの第一溶媒和殻内に配位している水分子

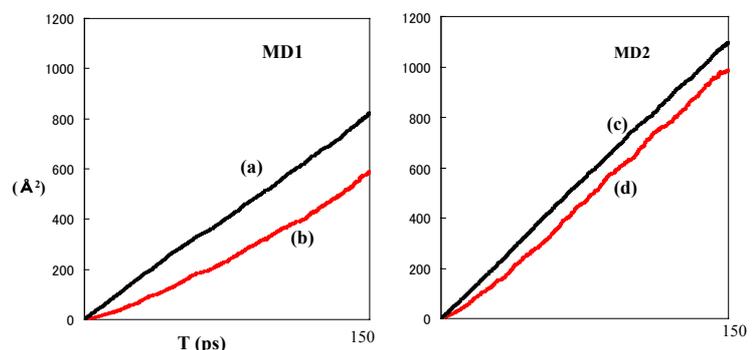


図3 MD1とMD2における水分子全体の平均二乗変位(a), (c)とC12主鎖のアミドプロトンに配位した水分子の平均二乗変位(b), (d)

表2 D:C12主鎖のアミドプロトンの第一溶媒和殻に配位した水分子の拡散係数 n1:C12主鎖のアミドプロトンに配位している水分子の平均水和数 n2:25ps以上同じ溶媒和殻に留まっていた水分子数とn1に占める割合(%)

系	D ($10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$)	n1	n2 (%)
MD1	4.80	16.2	5.0 (31%)
MD2	9.32	18.9	2.1 (11%)

本研究の一部は科学技術振興事業団の計算科学技術活用型特定領域研究開発事業「配列から機能への蛋白質ダイナミカルモデリング」に基づいて遂行された。

参考文献

- [1] E. A. Galinski, *Experientia*, **49**, (1993) 487
- [2] E. A. Galinski, *Adv. Microb. Physiol.*, **37**, (1995) 273
- [3] P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, *Science*, **217**, (1982) 1214.
- [4] T. Arakawa and S. N. Timasheff, *Biophys. J.*, **47**, (1985) 411
- [5] R. L. Foord and R. J. Leatherbarrow, *Biochemistry*, **37**, (1998) 2969
- [6] I. M. Plaza del Pino and J. M. Sanchez-Ruiz, *Biochemistry*, **34**, (1995) 8621
- [7] M. M. Santoro, Y. Liu, S. M. A. Khan, L. Hou and D. W. Bolen, *Biochemistry*, **31**, (1992) 5278
- [8] K. Suenobu, M. Nagaoka, T. Yamabe, and S. Nagata, *J. Phys. Chem. A*, **102**, (1998) 7505