

### 3A16 リガンド結合反応に共役したタンパク質の構造変化； カルモジュリンのCa<sup>2+</sup>結合におけるシミュレーション (神大・理) 小林千草、高田彰二

**【目的】** 本研究は、タンパク質へのリガンド結合反応の分子論的機構を解明することを目的としている。タンパク質のリガンド結合は多岐にわたり、生命活動を維持する上で最も重要な化学反応の一つである。特に金属イオンやリン酸化合物(ATPなど)の結合反応は、生体機能の中でも基礎となる部分のいくつか(シグナル伝達、呼吸、エネルギー代謝など)を担っている。強い電荷を持つこれらの化合物が、非結合状態(多くの場合水和していると考えられる)から結合状態へどのような反応経路を通るのか、タンパク質はどのようにリガンドを受け止めるのか、などの原子レベルの機構はいまだ十分に解明されていない。

本研究では、このような電荷を持つリガンド結合反応の一例として、カルシウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)結合タンパク質カルモジュリンへのCa<sup>2+</sup>の結合を取り上げ、分子動力学シミュレーションを行い、その機構の解明を目指した。特に1)水分子、結合部位であるタンパク質からのCa<sup>2+</sup>の配位数がどのように変化するのか、2)Ca<sup>2+</sup>結合部位(EFハンドのループ部分)の構造変化がどのように結合に影響を及ぼすのか、について注目した。

カルモジュリンは代表的なシグナル伝達タンパク質の一つであり、動物、植物などに広範に存在している。(図1)その機能の発現はCa<sup>2+</sup>濃度に依存しており、Ca<sup>2+</sup>濃度が上がるとEF-hand loopと呼ばれるCa<sup>2+</sup>結合部位に合計4つのCa<sup>2+</sup>が結合し、活性(Holo)型の構造へと変化する。活性型は、他のタンパク質のヘリックス部位に結合することで、シグナル伝達の機能を持つ。このCa<sup>2+</sup>結合時の分子構造変化やシグナル伝達機能など、多くの研究者によって実験、理論の両面での研究が行われている。

**【方法】** カルモジュリンの結合部位であるループ部分(図1)を取り出し、分子動力学法計算を行った。Holo構造ではCa<sup>2+</sup>はこのループ中の5つのアミノ酸と配位しており、そのうちの3つのアミノ酸は負電荷(2つのAspとGlu)を持つ。分子動力学計算はAMBERを用い、ポテンシャル関数はparm99を使用した。また、ループ部分のみでは構造を取ることは不可能であるため、主鎖の原子にループ部分の構造を保つような拘束をかけた。この拘束の強さを変化させることにより、ループ部分の柔軟性を変化させることができ、柔軟性の変化についても解析を行った。これらの手法を用いて、Ca<sup>2+</sup>と結合部位との距離に対してアンブレラサンプリングを行い、PMF(Potential Mean Force)を求めた。また、Ca<sup>2+</sup>結合部位、水分子との配位数の変化、構造変化もあわせて解析を行った。また、Ca<sup>2+</sup>の結合、解離の両方の反応に対してSMD(Steered MD)法を用いたトラジエクトリ計算もあわせておこない、静的、動的の両方からの解析を試みた。

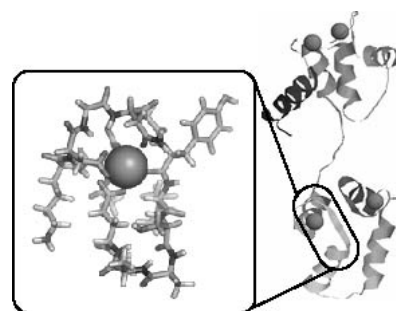


図1: カルモジュリン(Holo型)と結合部位のループ

**【結果】** 図2に反応におけるPMFを等高線で示す。横軸はHolo構造との側鎖のずれ(RMSD)、縦軸はCa<sup>2+</sup>とループとの直接の相互作用エネルギーをそれぞれ示している。Ca<sup>2+</sup>とループの結合エネルギーの減少(解離反応の進展)に伴って、ループの側鎖部分が一度大きく崩れ、その後、解離が進むに従い、ループの構造が再び元に戻る事が明らかとなった。図2の矢印はApo構造とHolo構造の側鎖のずれを示しており、最終的にはこの値へ近づいていくと考えられる。

それぞれの反応の段階でのループの構造、Ca<sup>2+</sup>の結合状態を更に詳しく解析するため、Ca<sup>2+</sup>の配位数を解析した。図3は配位数変化を示す。横軸はアンブレラサンプリングでの反応座標Rで、これはCa<sup>2+</sup>と配位原子との距離の総和である。縦軸はCa<sup>2+</sup>の配位数であり、実線は水分子、破線はループとの配位数をそれぞれ示している。この図から配位数が段階的に変化していることが見て取れる。また、PMF、構造が最も変化する領域で配位数があまり変化していないこともわかった。つまり、配位を保持したままループ構造が崩れ、その後、段階的にCa<sup>2+</sup>を解離しながら、元の構造に戻っていくという機構が明らかとなった。

また、SMD法によるトラジェクトリ計算から、アンブレラサンプリングによって得られたのと同様の反応機構が見られた。

**【まとめ】** カルモジュリンのCa<sup>2+</sup>結合反応において、以下のことが明らかとなった。

- 1) Ca<sup>2+</sup>との結合と結合部位であるループの構造変化(構造の崩れ)が同時に起きる
- 2) 結合反応はまず、負電荷を持つAspかGluの一つがCa<sup>2+</sup>と結合し、その後段階的に他のアミノ酸との結合を行う形で進む

これらの機構から、タンパク質、溶媒である水分子、Ca<sup>2+</sup>がお互いに強い相互作用を持ち、協同的な運動をしながら結合反応を進めていることが明らかとなった。本研究で示した機構は、他の強い電荷を持つようなリガンドの結合反応においても広く存在するのではないかと考えている。詳細は当日発表する。

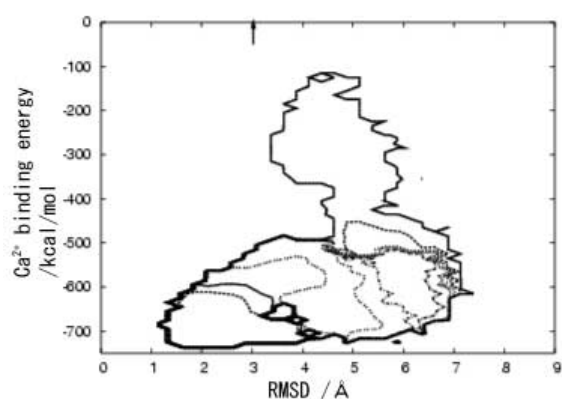


図2: Ca<sup>2+</sup>とループとの相互作用エネルギーと側鎖のHolo構造からのRMSD

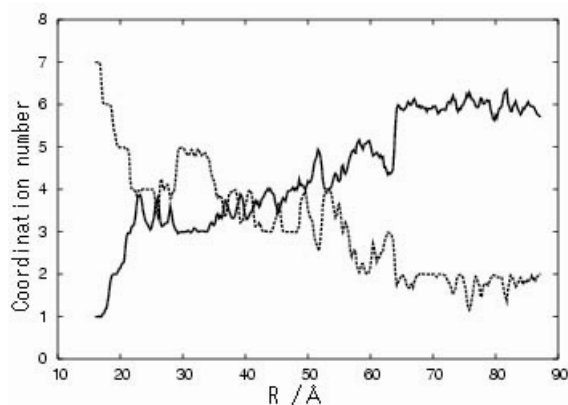


図3: 各反応段階におけるCa<sup>2+</sup>の配位数変化 水との配位数(実線) ループとの配位数(破線)