

# 蛋白質の高圧力計算シミュレーション研究 ジヒドロ葉酸還元酵素 DHFR 構造動態の解析

米 澤 康 滋<sup>1</sup>

## 要 旨

これまで、熱力学的側面から蛋白質の構造および機能を解析する手段として蛋白質物性の温度特性を研究する熱測定実験が重要な役割を果たしてきた。これに加えて最近、圧力を新たなパラメーターとする熱力学的研究が注目されている。圧力は温度と並び熱力学において重要な軸であり、蛋白質機能構造の圧力依存性を知ることで新たな知見が見出されることが大いに期待されている。一方で、熱測定と同様に蛋白質の圧力に関する実験的研究からは蛋白質の原子レベルでの詳細な情報が得にくい問題がある。計算科学シミュレーションは様々な熱力学的環境を精密に再現して原子レベルの情報を抽出できる特徴があるので、実験に対応する高圧力条件を再現して原子レベルでの詳細な情報を得ることでこの問題を克服することができる。本報告では現在までの蛋白質の機能構造に関する高圧力計算科学シミュレーションを簡単に紹介する。またジヒドロ葉酸還元酵素に対する高圧力計算科学分子シミュレーションを実施した結果について報告する。

キーワード：蛋白質、分子動力学シミュレーション、圧力

## 1. 緒 言

蛋白質は生命体を構成し生命現象を司る生命の最も重要な要素のひとつである。蛋白質は基本的に 20 種類のアミノ酸からなる 1 次元ポリマー鎖であるが、アミノ酸の配列に依存して特有な立体構造を形成して生命機能を発揮する。アンフィンセンの実験から蛋白質の構造形成は熱力学的過程であることが明確に示されており（アンフィンセンのドグマ）、蛋白質の構造及び機能を研究する上でその熱力学的背景を知ることが大変重要である。これまで蛋白質の熱力学を知る方法として熱測定による実験的研究が盛んに行われてきた。その結果、示差熱量測定器（DSC）や適定式熱力計（ITC）による熱力実験からエンタルピー・エントロピー補正効果等の様々な重要な知見が得られている。

現在、実験技術の向上から様々な蛋白質の構造が明らかになり、Protein Data Bank (PDB) に多くの立体構造データが蓄積されている。現在では、蛋白質の機能と構造の関わりがこの PDB のビクデータから解析されて蛋白質の基礎的研究に貢献している。このように蛋白質原子レベルの情報は、蛋白質の構造機能の解明に不可欠な要素となっている。ところが X 線結晶解析や NMR から得られた構造は、一つまたは高々数十個の静的な構造を提供するのみであり、熱力学的な多次元位相空間に分布する膨大かつ様々な蛋白質アンサンブルを網羅していない問題がある。

計算科学に基づく分子シミュレーションは、様々な熱力学的条件下の蛋白質の構造空間を幅広く探索してその熱力学的特性を精密に再現しかつ原子レベルの情報をも抽出できる大きな特徴がある。このため、近年の計算機技術の著しい発展とも相まって、蛋白質の分子シミュレーション<sup>[1]</sup>は実験を補佐し新たな知見をもたらす重要な方法として最近注目されている。

1. 近畿大学先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

ジヒドロ葉酸還元酵素 (Dihydrofolate reductase: DHFR) は 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酵素である [2]。DHFR はその酵素機能から制ガン剤の標的蛋白質としても重要で X 線や NMR 等による構造解析や熱力学的測定など、様々な研究がなされている蛋白質の一つである。これまでに DHFR の熱力学的研究も多くなされていてその構造と機能の温度特性に関する熱力学的特徴が詳細に報告されている。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 Met-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考えられている [3-5]。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報告されており蛋白質動態の典型的な研究対象と見なされている [6]。

圧力は熱力学で温度と同様に本質的なパラメーターの一つである。物質や分子の熱力学的特性を十分に解明するためには温度と共に圧力の効果も考慮に入れる必要がある。これまで殆どの蛋白質分子の熱力学的実験野や解析は常圧力下で行われてきたが、最近では高圧力下での実験が熱力学的解明の新たな知見を広げる有望な試みとして大変注目されている。国内でも、野生型 DHFR に対して 2000 気圧におよぶ高圧力 NMR の測定が実施されてゆらぎ大きい領域が圧力に敏感である等が報告されており、蛋白質のダイナミクスが圧力によって大きな影響を受けることが示されている。本報告では、先の高圧力 NMR 実験で示された圧力による効果の起源やそのメカニズムの原子レベルの理解を進めるために、常温及び様々な高圧力下 (1000 気圧と 2000 気圧) で DHFR 蛋白質の分子動力学シミュレーションを実施した研究について報告する。

## 2. 計算方法



図 1  
シミュレーション計算に用いた DHFR (PDB-ID) 7DFR の構造、蛋白質部分はリボンモデルで描画している。ヘリックスは紫色、シートは黄色、葉酸はスペースフィリングモデルで描画した。酸素原子は赤、水素原子は白、窒素原子は青、炭素原子は空色で示している。

DHFR の構造データは、PDB の大腸菌由来の DHFR の X 線構造解析結果である PDB-ID 7DFR を用いた。蛋白質を古典的に記述する力場は Amber99 力場パラメーターを用いている [7]。結合する葉酸リガンドには対応する Amber99 パラメーターが存在しないために Amber の一般力場である Gaff パラメーターから自作した。PDB から得られた DHFR と葉酸の複合体を分子シミュレーションの中心に配置して周りを予め平衡化した水分子モデル TIP3P [8] に浸して、重なる水分子を排除した。系を生理的イオン濃度 (150mM) にするために、17 個の塩素イオンと 30 個のナトリウムイオンを水分子と交換して配置した。図 1 に水素を付加した 7DHR の構造を示す。図 2 に計算に用いた系を示す。

この系を  $63\text{\AA} \times 60\text{\AA} \times 72\text{\AA}$  の大きさの周期的境界条件に整形した。水素原子に関わる化学結合には SHAKE アルゴリズムを適用して化学結合長を固定した [9]。超距離相互作用であるクーロン相互作用には、Particle Mesh Ewald (PME) 法を用いた [10]。PME 法の実空間相互作用カットオフ値は  $12\text{\AA}$  に設定した。

PME法のグリッドサイズは、60x60x72としてEwald法からの誤差を十分小さくしている。運動方程式の積分方法はLeap-Frog法を用いた。時間刻み幅は2fsとした。用意した系に存在する高エネルギーコンタクトを緩和するためにエネルギー最小化シミュレーションを、1000ステップ実行した。最小化実行後に系を3Kから310Kに徐々に昇温した。310Kに達した後、定温定圧（1気圧）条件化で1nsシミュレーションして系を安定化させた。温度のコントロールはNose-Hoover法を用いて、定温定圧のコントロールはNose-Andersen法を用いた<sup>[11]</sup>。安定した系を基にしてデータ取得のためのシミュレーションを50ns行いそのデータを、解析用に10ps毎に保存した。この同じ系を用いて、1000気圧及び2000気圧のシミュレーションを同様に実施してデータを取得した。

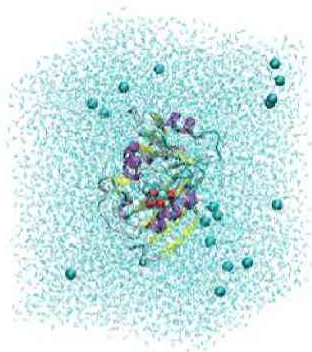


図2

シミュレーション計算に用いたDHFRの系。蛋白質と葉酸の表示方法は図1と同じである。蛋白質周りの水分子を空色のライン表示で、イオンを水色のスペースフィリングモデルで示した。

### 3. 結果と考察

#### 1) RMSDによる解析

図3に、1気圧及び1000気圧、2000気圧のシミュレーションから得られた根平均二乗偏差（Root Mean Square Deviation : RMSD）を示す。RMSDの基準には結晶構造7DFRを用い、蛋白質主鎖のC<sub>α</sub>原子のみを使用した。以下の式(1)にRMSDの定義式を示す。Mは蛋白質の総質量でm<sub>i</sub>はi番目の原子の質量を、r<sub>i</sub>はi番目の原子の位置座標を示す。Nは解析に用いた原子数である。

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t) - r_j(t=0)\|^2} \quad \text{式(1)}$$

図から明らかなように1気圧と1000気圧のシミュレーションではRMSD値は安定している事がわかる。2000気圧の結果からは14nsec以降にRMSD値の上昇が見られるがその後急速にもとの平均値に戻っている様子がわかる。この解析からそれぞれの異なる気圧で実施したシミュレーションがいずれも短時間の間にRMSD値が安定した状態に移行したことを示している。

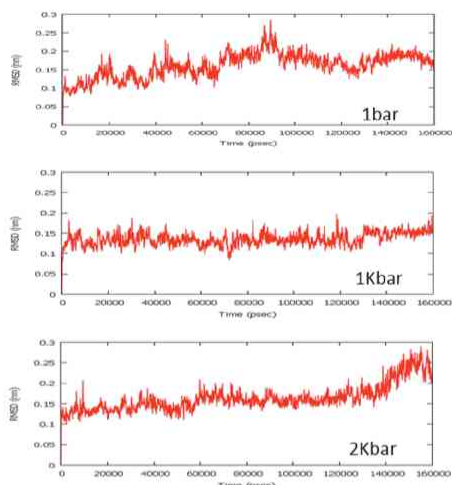


図 3

DHFR の RMSD 時間変化。横軸は時間で単位は psec、縦軸は RMSD で単位は nm。上から、1 気圧、1000 気圧、2000 気圧の DHFR 定温定圧シミュレーションから得られた結果を示している。

## 2) 慣性半径による解析

慣性半径 (Radius of Gyration:  $R_g$ ) は蛋白質の全般的な形状とその時間変化を知るのに有用な指標である。式 (2) に慣性半径の定義式を示す。

$$R_g(t) = \sqrt{\frac{\sum_i \|r_i(t)\|^2 m_i}{\sum_i m_i}} \quad \text{式 (2)}$$

式 (2) で用いた変数の定義は、式 (1) と同様である。図 4 にシミュレーションの解析から得られた慣性半径の時間変化を示す。

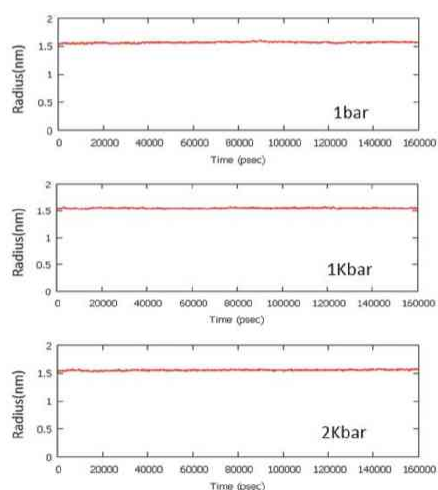


図 4

慣性半径の時間変化、横軸は時間で単位は psec、縦軸は慣性半径を示す。上から順に 1 気圧、1000 気圧及び 2000 気圧の DHFR シミュレーションの結果をプロットしている。

図 4 からは、1 気圧、1000 気圧及び 2000 気圧の慣性半径値は時間の殆ど依存していないことが分かる。また圧力が大きく異なるにも関わらず全ての慣性半径がほぼ同じ慣性半径を示していることは DHFR の形状がこの圧力範囲では圧力に依存しないことを示している。



### 3) 各残基のゆらぎ (RMSF)

基準となる構造からの熱力学的なゆらぎは蛋白質の機能と構造を結びつける上で大変重要な知見である。RMSF (Root Mean square fluctuation) は式 (1) と同様の定義を用いて各々の残基毎のゆらぎを評価する指標である。図 5 に解析から得られた RMSF を示す。

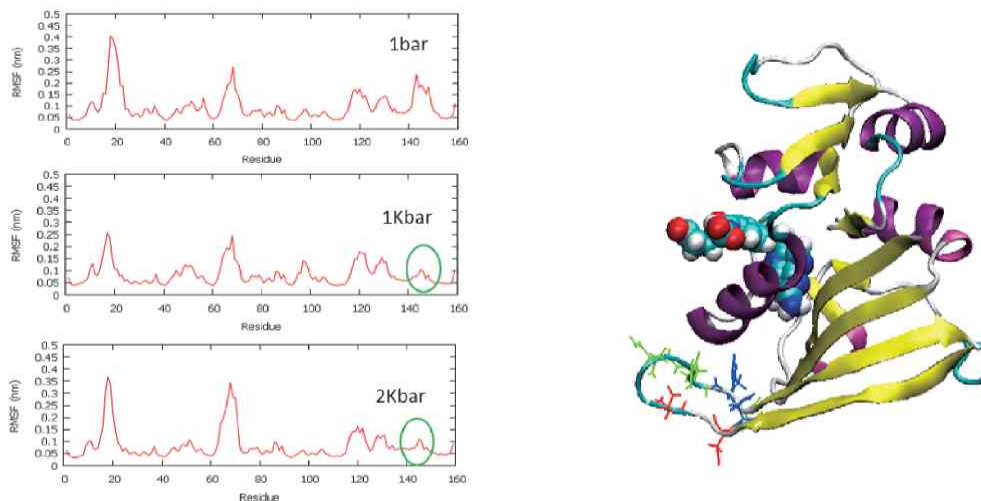


図 5 左) DHFR の RMSF、上から 1 気圧、1000 気圧及び 2000 気圧の結果を示す。横軸はアミノ酸の残基番号、縦軸は RMSF 値を示している。緑丸は高圧力下で抑制されたゆらぎを示すアミノ酸範囲を示している。  
右) RMSF 値で高圧力シミュレーションに観察された大きなゆらぎの抑制効果を示したアミノ酸残基、140 から 150 の DHFR 構造中の位置をスティック表示した。

図 5 に解析から得られた RMSF を示す。常圧のシミュレーションと、高圧下のシミュレーションを比較するとアミノ酸番号が 140 から 150 において常圧力では観測されていたゆらぎが 1000 気圧と 2000 気圧の高圧力下では抑制されていることが分かる。この 140 番から 150 番のアミノ酸の DHFR 構造中の場所を調べたところ、GH-loop と呼ばれる部位にあることが分かった。この GH-loop は DHFR の酵素機能の発揮に重要な役割を果たしていると考えられている Met-loop にも相互作用可能な場所に位置していることからその機能への直接的な効果が推測される。

### 4) 平均最小残基間距離による解析

アミノ酸のゆらぎとともに、アミノ酸間の相対的な距離のゆらぎも蛋白質の機能と構造の特徴を抽出するのに重要な解析方法である。図 6 にシミュレーションで観測された DHFR 中のアミノ酸残基の  $C_{\alpha}$  原子間の最小距離をプロットした結果を示す。

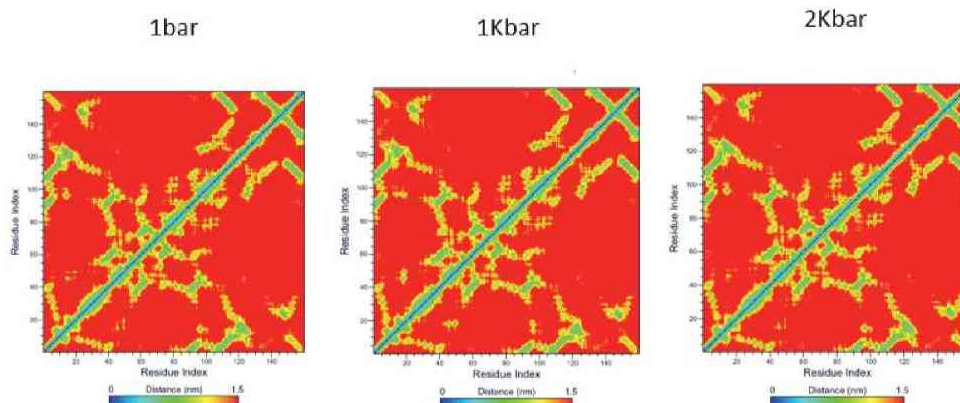


図6 DHFRのアミノ酸残基の $C_{\alpha}$ 原子間の最小距離マップ、横軸と縦軸はアミノ酸の番号で色が青に近づくほど距離が近く、色が赤いほど距離が遠いことを示している。左から、1気圧、1000気圧及び2000気圧の解析結果を順に示している。

図6から、アミノ酸残基のゆらぎが圧力によって異なる振る舞いを示すにも関わらず、アミノ酸残基間距離には圧力依存性が殆ど観察されないことが分かる。このことから圧力によってDHFRの構造を維持するためのネイティブコンタクトは保たれていることが分かった。すなわち圧力効果はDHFRの基本的な構造は変化させないが、そのゆらぎを大きく変化させる事が明らかとなった。

### 5) Cross Correlation Matrix による解析

Cross Correlation Matrix は以下の式(3)で定義されるテンソル量で、蛋白質原子間の相対的な運動相関を解析する為に良く用いられている。

$$C_{ij} = \left\langle M_{ii}^{-\frac{1}{2}}(r_i - \langle r_i \rangle) M_{jj}^{-\frac{1}{2}}(r_j - \langle r_j \rangle) \right\rangle \quad \text{式(3)}$$

式(3)の $M_{ij}$ は質量行列で原子iとjの積 $m_i m_j$ をij要素とする。 $r$ は解析に用いたi番目の原子の位置を示している。また $\langle \rangle$ の記号はアンサンブル平均を取ること示している。

図7に解析結果のCross Correlation Matrixを示す。図7からは圧力が異なる時には、蛋白質内部で距離相関が複雑に変化していることが分かる。対角線に近い領域では予想されるように正の相関が高く示されている。またヘリックスやシート等の2次構造を形成する領域同士でフォールディングコンタクトによる相関が見られるもののその殆どが負の相関を示していることは大変興味深い結果である。この図の結果のみからはアミノ酸残基間の相関状態を定量的に述べることは難しく更なる解析が必要であることが分かる。

以上の解析からDHFRに対する圧力の影響の特徴が抽出できた。その結果は、DHFRの基本的な構造は圧力の上昇によって大きな摂動を受けずその構造が保たれることが分かった。一方、熱力学的に重要な要素である各々のアミノ酸のゆらぎとアミノ酸残基間の距離には圧力に依存する傾向がはっきりと観測された。すなわち計算科学による分子動力学シミュレーションで蛋白質の構造機能による熱力学的形解析が可能でありより精密なシミュレーションと解析を実施することで圧力による蛋白質の解明研究が推進可能であること明確に示すことができた。



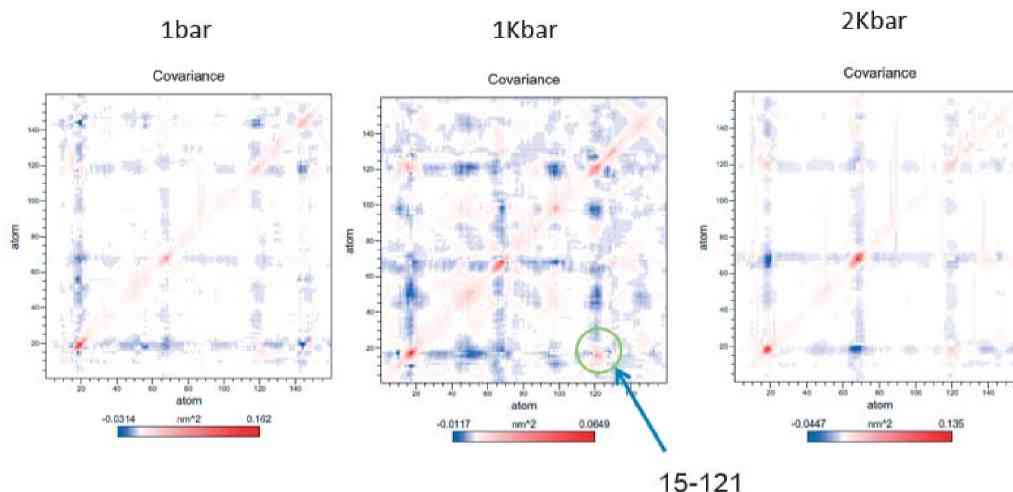


図7 DHFRの Cross Correlation 解析で得られた結果。対角線上に主に部分する赤い領域は正の相関が高い領域を、対角線から外れた領域に主に分布する青い領域は負の相関が高い領域を示す。左から順に、1気圧、1000気圧及び2000気圧の結果を示している。1kbarに見られる特徴ある正の相関部分を緑丸で示した。

#### 4. 結 論

高圧力がDHFRの構造及び活性に与える影響を知るために長時間分子動力学計算を実行した。慣性半径には、全く圧力依存性が見られなかった。一方ではRMSFで圧力による顕著な影響が見られた。すなわち残基140-150 (GH-loop) 部分において1000気圧及び2000気圧の高圧力下でRMSDの大きな抑制が観測された。一方、平均最小C<sub>α</sub>間距離の比較からは優位な差異は検出できなかった。Cross Correlation 行列には優位な差が見られた。その差異は、Met20ループの動態に起因すると推察される。

本報告の結果として、分子動力学シミュレーション計算とその解析においてDHFRの基本的な静的な平均構造は圧力に依存して大きくは変化しないことが明らかとなった。しかし、シミュレーション解析結果からは熱力学的に重要であるアミノ酸残基のゆらぎが圧力に大きな依存性を示すことと、アミノ酸残基間の距離の相関が圧力によって大きく変動する事実が確認された。すなわち分子シミュレーションによって圧力がDHFRのゆらぎに大きな影響を与えている事実を明確に示すことができた。今後計算分子動力学シミュレーションは高圧力下での蛋白質の機能及び物性を研究する有用なツールとなることが予想される。

#### 5. 参考文献

1. McCammon, J.A.; Gelin B.R.; Karplus M.; Wolynes P.G., The Hinge-Bending Mode in Lysozyme. *Nature* 1976, 262, 325-326.
2. Chen MJ, Shimada T, Moulton AD, Harrison M, Nienhuis AW. Intronless human dihydrofolate reductase genes are derived from processed RNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982, 79 (23): 7435-9.
3. Matthews DA, Alden RA, Bolin JT, Freer ST, Hamlin R, Xuong N, Kraut J, Poe M, Williams M, Hoogsteen K. Dihydrofolate reductase: x-ray structure of the binary complex with methotrexate. *Science* 1977, 197 (4302): 452-455

- 4 . Filman DJ, Bolin JT, Matthews DA, Kraut J. Crystal structure of Escherichia coli and Lactobacillus casei dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. II. Environment of bound NADPH and implications for catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 1982, 257 (22): 13650–13662.
- 5 . Benkovic SJ, Fierke CA, Naylor AM. "Insights into enzyme function from studies on mutants of dihydrofolate reductase". *Science* 1988, 239 (4844): 1105–10.
- 6 . Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; and Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 1983, 79, 926.
- 7 . Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M. Jr.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; and Kollman, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179–5197.
- 8 . Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; and Berendsen, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* 1977, 23: 327–341.
- 9 . Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; and Pedersen, L. G. A smooth particle mesh ewald method. *J. Chem. Phys.* 103,1995, 8577–8593.
10. Nose, S. A unified formulation of the constant temperature molecular-dynamics methods. *Journal of chemical physics* 1984, 81 (1): 511–519, Hoover, William G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions". *Phys. Rev. A (American Physical Society)* 1985, 31 (3): 1695–1697



---

英文抄録

Computational Simulation Study on Proteins Under High Pressure Condition;  
A Molecular Dynamics Study on DHFR enzyme

Yasushige Yonezawa<sup>1</sup>

**Abstract**

Thermal measurements and experiments have been provided significant insight into the structural characteristics and thermodynamical properties of proteins. Recently, in addition to the thermal measurements, studies on proteins under very high pressure conditions are attract much attention to extract the novel thermodynamic properties. Pressure is a substantial axis of thermodynamical parameters and should play a significant role in mechanism and structural properties of proteins. In this report, we have conducted molecular dynamics simulations in terms of DHFR, in a variety of pressure ranges at 1 bar, 1000 bar, and 2000 bar and analyzed the data from the simulations. The results including RMSD, Radius of Gyration, Distance map, clearly show that pressure does not much impact on the global averaged static properties of DHFR. However RMSF and Cross Correlation analysis in terms of the amino-acid residues provides significant impact on thermodynamically important fluctuation properties for the amino-acid residues, indicating molecular dynamics simulations using high pressure are useful in thermodynamic studies on proteins.

Key words: protein, molecular dynamics simulation, high pressure

---

1. High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology, Kinki University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

