

高圧力下における深海生物由来ジヒドロ葉酸還元酵素 DHFR 構造動態の計算科学研究

米 澤 康 滋¹

要 旨

高圧力下に生存する深海生物はその高圧力環境に適した進化を遂げている。その進化は細胞機能の殆どを司る蛋白質にも反映されていることが最近の研究から明らかとなって来た。一般に常圧下（1気圧）に生存する蛋白質は高圧力下でその機能及び構造を変化させ多くの場合は機能が低下する。従って高圧力下に暮らす生物（深海生物）の蛋白質は高圧力に対して最適な分子進化を遂げていることが予想される。このような背景のもと高圧力下での蛋白質構造機能を研究する実験及び理論的試みが世界中各地で進められている。本研究では、深海生物 *Moritella profunda* の DHFR を、*Escherichia coli* の DHFR と比較することでその構造及び機能動態・構造揺らぎ、及びその圧力依存性を様々な手法で解析した。その結果、深海生物由来 DHFR の構造揺らぎは高圧力下でも機能を失わないような独自の構造動態を示す進化を遂げていることを示唆する結果を得た。

キーワード：蛋白質、分子動力学シミュレーション、高圧力、深海生物

1. 緒 言

アンフィンセンの研究以後、蛋白質は物理化学の法則に従うことが明確となった。すなわち蛋白質の構造と機能は物理化学的な研究から明らかにできる。しかし蛋白質は複雑な高分子であるためにその構造と機能は未だに不明なことが多い。これまで1次元のアミノ酸の鎖から3次元のタンパク質立体構造が構成される原理が精力的に成されてきた。その結果、蛋白質の構造空間は縦軸を有効エネルギーとして横軸を構造エントロピーとすると急峻なファネル（漏斗）型をしているとする概念が広く受け入れられている。一方、このように安定な蛋白質構造空間の構造エントロピーは制限されているが、蛋白質の熱ゆらぎの構造空間が存在してゆらぎで駆動される各々の蛋白質に特有のコンフォメーション変化が存在している事が様々な実験結果から支持されている。

我々が普段目にする生物の持つ蛋白質の多くは様々な環境下で最適かつロバストに機能を発揮することが知られている。実際、一部の生物においては、高温に生存する生物（高度好熱菌）、高塩度環境に生存する菌類、さらには深海の高圧力下に生存する深海生物などが知られている。このなかでも特に深海生物は地球上の広い範囲に分布して多種多様な生物種が存在することが知られている。これまで好熱菌の蛋白質を対象としてその蛋白質の温度依存性や高温耐性に関する研究が進められその構造物性が明らかにされている。ところが高圧力下の蛋白質の構造及び機能研究はその実験的な難しさからその研究がこれまで十分に進展しているとは言いがたい。

本レポートでは、蛋白質の高圧力下での構造と機能の研究を分子動力学シミュレーションで研究した結果を報告する。これまで様々な研究者が静的な蛋白質の構造を決定しその構造と機能を明らかにしてきたが、高・低温や高・低圧力といった極限条件下での、熱力学的かつ分子のダイナミックスに関わる機能の

解析には動的な構造機能の研究が不可欠である。NMR や赤外等の分光学的な研究でこのダイナミックスを明らかにしようとする試みが現在進められているがその情報は大変限られたものである。これに対して分子シミュレーションは、最近の計算機科学の進展と相まって様々な蛋白質及び DNA、RNA の研究に利用されて実験を補助する有用なツールとして認識されている。特に分子シミュレーションの内、分子動力学シミュレーション^[1] は実験では成し得ない精密な原子の時間空間情報を比較的容易に得ることができる特徴を持つ。

この研究で我々は、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ために、ジヒドロ葉酸還元酵素 (Dihydrofolate reductase : DHFR)^[2-5] を研究対象とした。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重要な酵素であり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ある。様々な種に存在する DHFR の中で、我々は深海生物 *Moritella profunda* の DHFR (mpDHFR : 163 アミノ残基) を研究対象として、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た。また比較対象として *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同様に実施した。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と考えられている。これまでに DHFR の熱力学的研究が多くなされており、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。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考えられているが^[3-6]、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^[6]。

一連の分子動力学シミュレーション実施とそのデータ解析の結果、データ量は十分ではないが、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事が示唆された。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考えられる。すなわち深海生物 *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思われる。

2. 計算方法と解析手法

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^[6] と深海生物由来 DHFR の 2ZZA を用いた。我々は結合分子による効果を分けて考えるために、本計算科学研究ではこれらの PDB 構造から、結合小分子を取り除いた apo 型-DHFR を対象とする。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^[7] 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^[8]。図 1 に 1RX2 の立体構造を示す。

この系を周期的境界条件に整形し、蛋白質表面から各周期的境界への距離は 12Å 以上となるように設定した。水素原子が関わる化学結合には SHAKE 法を適用して化学結合長と化学結合角を固定した^[9]。長距離静電相互作用には、Particle Mesh Ewald (PME) 法を用いた^[10]。PME 法の実空間の相互作用カットオフ半径は 8Å に設定した。PME 法のグリッドサイズは、1.2Å 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 法で、時間刻み幅は 2fs とした。これまでに準備した系に存在する高いエネルギーの原子間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

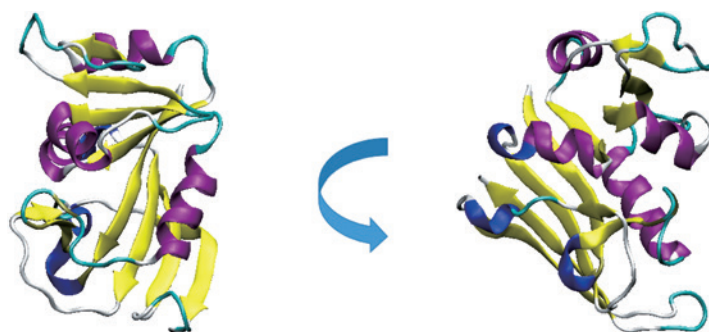


図1 本シミュレーション計算に用いた ecDHFR (PDB-ID: 1RX2) の構造。蛋白質をリボンモデルで描画し、2次構造の内ヘリックス構造は紫色、シート構造は黄色で色分けして描画した。左図を90度回転させたものが右図。

310K に昇温し定温分子動力学シミュレーションで平衡化した。その後定温定圧 (1 気圧) 条件化で 1ns シミュレーションして系をさらに安定化させた。温度のコントロールは Nose-Hoover 法^[11] を用いて、定温定圧のコントロールは Parrinello-Rahmann 法を用いた^[12]。安定した系を基にしてデータ取得をする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、2000 気圧のシミュレーションを同様に実施して構造軌跡データを取得した。

3. 計算実験結果と考察

1) RMSD による解析

図2に、ecDHFR、mpDHFRに関する1気圧及び2000気圧の分子動力学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 1RX2, 2ZZA を用い、RMSDの算出には蛋白質主鎖の C_{α} 原子のみを使用した。

式(1)にRMSDの定義を示す。 M は蛋白質の総質量で m_i は i 番目の原子の質量を、 r_i は i 番目の原子の位置座標を示す。 r_j は基準系を示している。 N は解析に用いた全 C_{α} 原子数である。

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

図2から明らかなように1気圧と2000気圧のシミュレーションの全てでRMSD値は良く安定している。mpDHFR (2000 気圧) の結果には 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ので平衡状態からは大きく外れていないことを示している。この解析からそれぞれの異なる圧力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 値が安定した熱力学的な平衡状態に移行したことが示された。

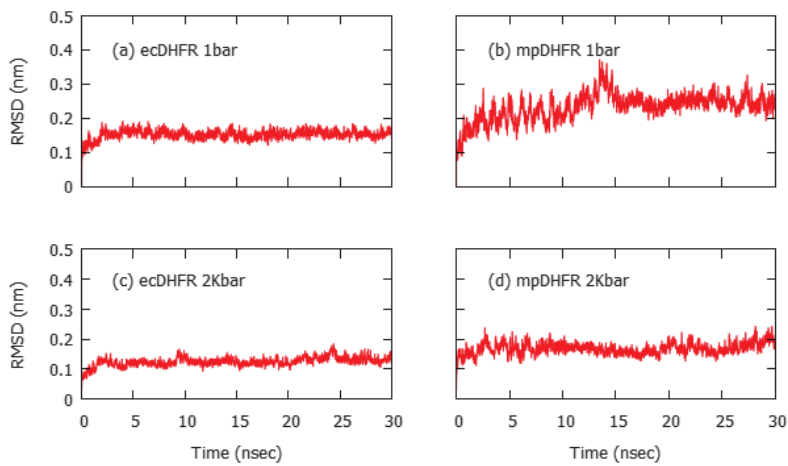


図2 DHFRのRMSDの時間変化。上から、(a) 1気圧でのecDHFR、(b) 1気圧でのmpDHFR、及び(c) 2000気圧でのecDHFR、(d) 2000気圧でのmpDHFR、のRMSDをそれぞれ示している。

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3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3からは、1気圧及び2000気圧の慣性半径値は時間に殆ど依存していない

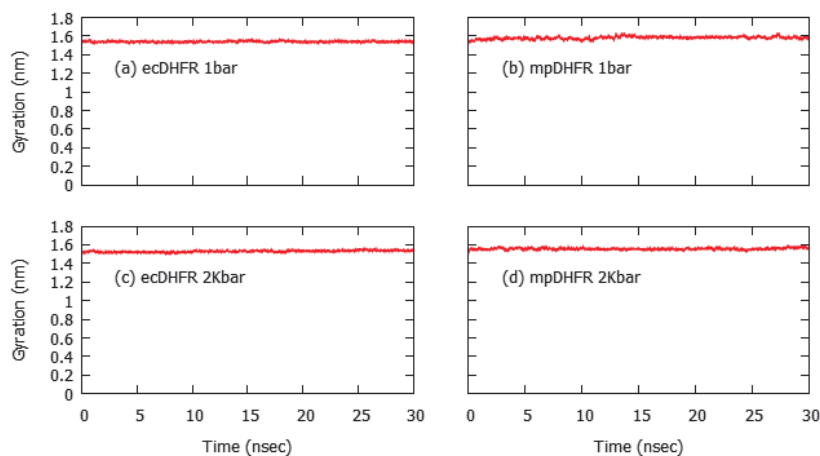


図3 慣性半径の時間変化、横軸は時間、縦軸は慣性半径を示す。(a) ecDHFR 1気圧、(b) mpDHFR 1気圧、(c) ecDHFR 2000気圧、(d) mpDHFR 2000気圧

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 の形状がこの圧力値周辺では圧力に依存しないことを明確に示している。

3) 各残基のゆらぎ (RMSF)

根平均二乗揺らぎ (Root Mean square fluctuation : RMSF) 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一般的な指標である。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。図 4 に RMSF を示す。全ての系に対して主鎖 C_{α} 原子揺らぎは似た状態を示すことが分かる。実際、リガンド結合に重要であると考えられている 9 から 24 番目にかけてのアミノ酸で構成されている M20 ループ、及び 116 から 132 番目のアミノ酸で構成される FG ループ部分の揺らぎはすべての DHFR シミュレーションで同様の振る舞いを見ることができる。

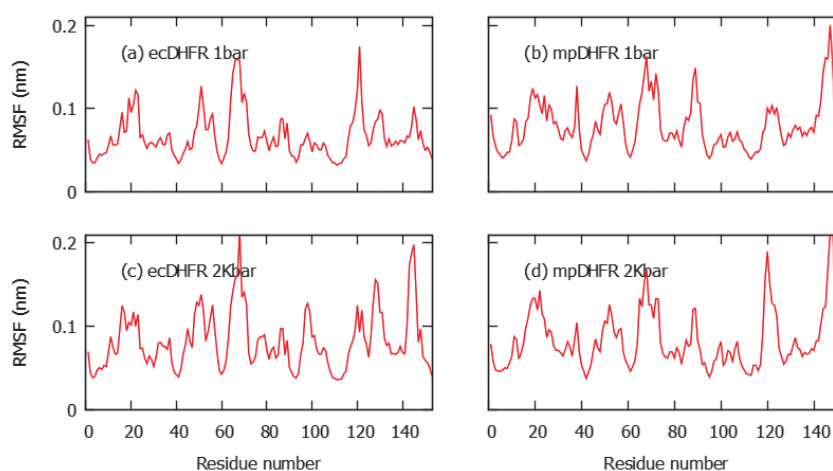


図 4 DHFR の RMSF : (a) ecDHFR 1 気圧、(b) mpDHFR 1 気圧、(c) ecDHFR 2000 気圧、(d) mpDHFR 2000 気圧、の結果を示す。

一方で、1 気圧では ecDHFR と mpDHFR は、150 番目付近の残基の揺らぎが大きく異なり、ecDHFR にはなかった大きな揺らぎが mpDHFR で観測されている。142-149 番目のアミノ酸で構成される GH ループと呼ばれる部分は DHFR 機能発現にかかわる揺らぎに重要であることが指摘されている部位である。この GH ループの揺らぎの増大は 1 気圧の ecDHFR 以外の全てのシミュレーション結果で観測されている。さらに mpDHFR では 1 及び 2000 気圧共に、83-90 番のアミノ酸残基から構成される E ヘリックスと呼ばれる部位で ecDHFR には殆ど観測されなかった大きな揺らぎが見られる。この E ヘリックスのダイナミックな変化は、これまでの DHFR に関する実験及び理論研究では全く指摘されてこなかった新たな現象であり興味深い。

4) 主成分解析による大きな蛋白質揺らぎの解析

蛋白質の機能発現に関わる揺らぎは、時間スケールの短い (数ピコ秒から数百ピコ秒) 局所的な構造揺らぎではなく、時間スケールの長い (数 10 ナノ秒から数ミリ秒) に及ぶ広域な蛋白質部分の動きであると考えられている。ところが高々数マイクロ秒程度の分子動力学シミュレーション研究から直接にこの長い揺らぎを同定することは大変困難である。このような蛋白質の大きな領域に渡る長時間の揺らぎを短い分子シミュレーション結果から抽出するために主成分解析手法 (Principal Component Analysis method :

PCA) が有用である。PCA は、分子シミュレーションから得られた平均構造の周りの構造分散を代数的に評価して、分散に対して寄与の大きなモードから小さなモードまでを決定することができる。特に寄与の大きなモードは蛋白質の長時間で大きな領域にまたがる揺らぎに対応している。従って PCA の寄与の大きなモードを解析することで酵素機能に関わる重要な揺らぎを特定することが可能となる。

PCA は分子動力学シミュレーションの結果を使って以下の式で計算される。

$$C = \langle (\mathbf{q} - \langle \mathbf{q} \rangle)^T (\mathbf{q} - \langle \mathbf{q} \rangle) \rangle \quad \text{式 (3)}$$

ここで C は共分散行列を示す。 \mathbf{q} は質量で重み付けされた N 個の蛋白質 C_α 原子の位置 (横) ベクトルを示す。 $\langle \rangle$ はアンサンブル平均値を取ることを示し、上付き添字 T は縦ベクトルに変換されたベクトルであることを示している。この行列式を解くことで、 N 個の固有ベクトルと固有値を決定できる。この固有ベクトルは蛋白質の集団的な揺らぎに対応し、その固有値は固有ベクトルの重みに対応している。図 5 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。この図からは、ecDHFR の主要な揺らぎは 1 気圧の場合と 2000 気圧の場合とよく似ている振る舞いをしている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。

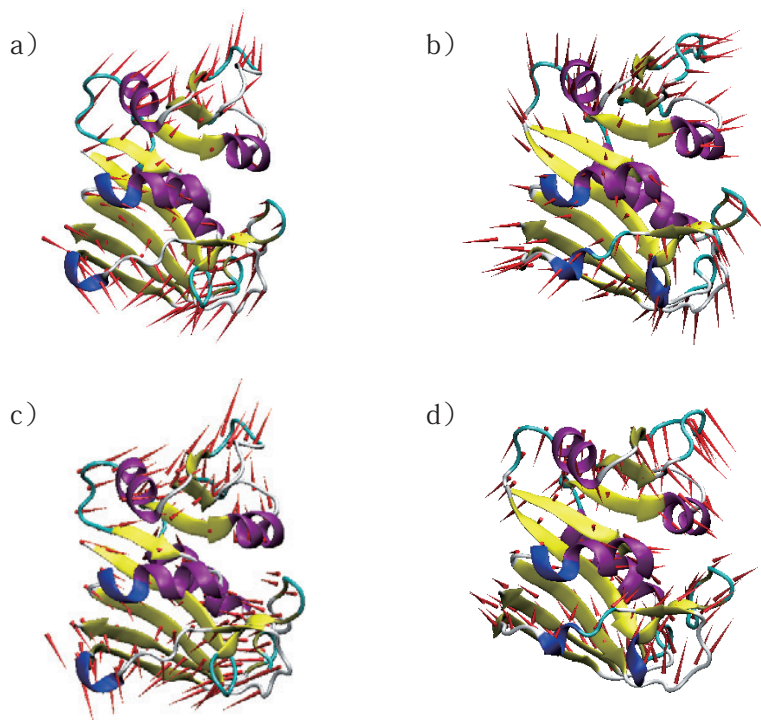


図 5 分子動力学シミュレーションデータを PCA 解析する事により得られた第一固有ベクトルを ecDHFR 及び mpDHFR の構造に重ねあわせて表示した。a) 1 気圧の ecDHFR、b) 1 気圧の mpDHFR、c) 2000 気圧の ecDHFR、d) 2000 気圧の mpDHFR. それぞれの固有ベクトルを、対応する C_α 原子を始点とするコーン状の矢印 (赤色) で示している。

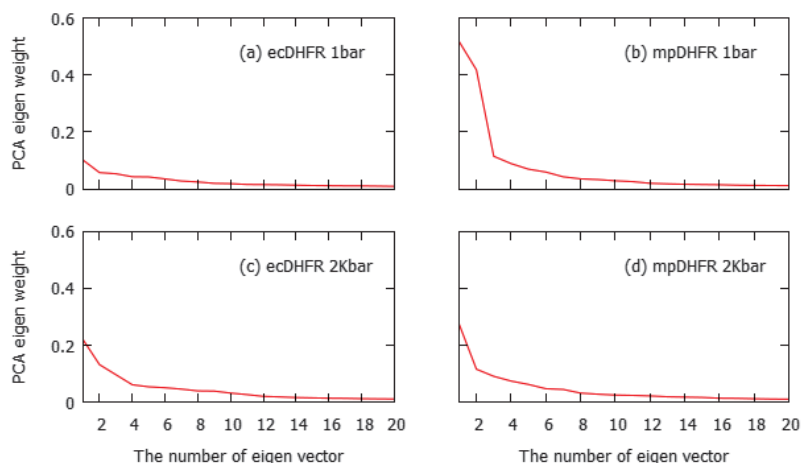


図6 PCA解析で得られた1番目から50番目の固有ベクトルの重み。それぞれ(a) ecDHFR 1気圧、(b) mpDHFR 1気圧、(c) ecDHFR 2000気圧、(d) mpDHFR 2000気圧、の結果を示す。横軸で左側から順に固有ベクトルの大きなものからその重みを縦軸に示している。

図6から1気圧ではecDHFRの固有ベクトルの固有値は1番目から10番目に渡って広く分布しているのに対して、1気圧のmpDHFRの固有ベクトルは1番目から6番目までの重みの比率が大きい事が示されている。これはecDHFRとmpDHFRの構造動態が本質的に異なることを意味している。一方、2000気圧の状態では、ecDHFRとmpDHFRの固有値の重み分布は一致位置しており高圧力下ではその違いは消失することが分かるが、その生物学的意味は現時点では明らかではない。

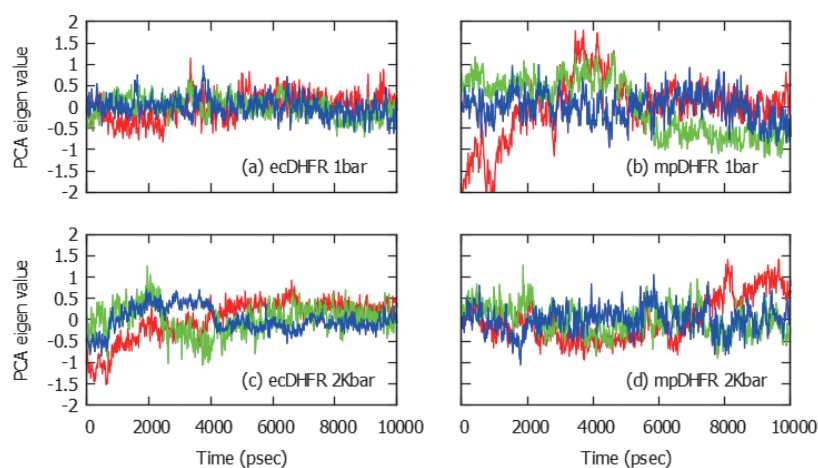


図7 シミュレーションから得られた構造を第一固有値ベクトルに射影しその時間推移をプロットした。a) ecDHFR; 1気圧、b) mpDHFR; 1気圧、c) ecDHFR; 2000気圧、d) mpDHFR; 2000気圧をそれぞれ示している。赤色の線は第一固有値を、青色の線は第2固有値を、緑色の線は第3固有値をそれぞれ示している。

さらにDHFRの構造揺らぎがどのような振る舞いをするかについて詳細に調べるためにPCA成分への構造揺らぎの射影値を解析した。図7にPCA解析から得られた第1から第3固有値ベクトルに対して各

DHFR の揺らぎがどのように時間推移しているかをプロットした。1 気圧の ecDHFR に関しては、射影値は安定しており多くのモードを使った揺らぎが運動性を支配していることが分かる。2000 気圧の場合の射影値も同様の傾向を示している。一方、mpDHFR は、1 番目から 4 番目のモードが蛋白質の運動性を支配していることを反映してその固有ベクトルに対する時間構造の射影値は大きく揺らいでいることが示されている。

4. 結 論

蛋白質は熱力学的法則に支配される生体高分子である。これまで蛋白質機能及び構造の温度に依存する熱力学的性質よく調べられてきたが、圧力に関する熱力学的性質や構造機能に関する研究は多くは成されてきていない。圧力は熱力学において主要なパラメータの一つでありこのパラメータに関する研究は重要である。我々は、深海の高圧力下に生存する深海生物の蛋白質の構造動態を解明する目的で良く性質の調べられている DHFR をモデル蛋白質として、*Moritella profunda* の DHFR 及び *Escherichia coli* の DHFR の 1 と 2000 気圧の分子動力学シミュレーションを実施し得られたデータを解析した。その結果、PCA 解析から得られた固有ベクトルで示される mpDHFR と ecDHFR の揺らぎの構成モードが著しく異なることが示唆され、さらに E ヘリックスの揺らぎが mpDHFR では増大していることも示唆された。しかし今回使用したデータの計算実時間が 30nsec と大変短いことからこれらの結果についてはさらに長時間の計算による検証が必要である。mpDHFR は高圧力でその活性が変化する興味深い現象が実験的に観測されている。本研究で見出された ecDHFR と mpDHFR の大きな揺らぎに現れた運動性の違いがこの活性の変化に関わ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. Sawaya, M.R., Kraut, J. "Loop and subdomain movements in the mechanism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: crystallographic evidence." (1997) *Biochemistry* 36: 586-603
7. 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.
8. Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M. C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T.,

-
- Caldwell J., Wang J., Kollman P., "A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations" *J Comput. Chem.* 2003 Dec; 24 (16): 1999-2012.
9. 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.
 10. 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.
 11. Nose, S. A unified formulation of the constant temperature molecular-dynamics methods. *Journal of chemical physics* 81 (1): 511-519. (1984)
 12. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* 52, 1981, 7182.

英文抄録

Molecular Dynamics Simulation with Principle Component Analysis Study
on the Dynamics of DHFR Protein from *Moritella profunda*
at High Pressure Condition

Yasushige Yonezawa¹

Abstract

Organisms live in a variety of extreme environmental conditions such as high/low temperature, high salt concentration and also high pressure. For instance, a number of organisms have been so far discovered at deep sea. It is believed that the deep sea organisms have been evolved with adaptation to high pressure. In recent decades, proteins of the deep sea organisms have been isolated like those from thermophilic organisms. Here, in order to elucidate the adaptation mechanism to the high pressure, we have conducted extensive molecular dynamics simulation studies at high (2000 bar) and normal pressure conditions using DHFR from a deep sea organism *Moritella profunda* (mpDHFR). We also simulated DHFR from *Escherichia coli* (ecDHFR) for comparison. We took a trajectory from the simulations and performed several analyses involving RMSD, RMSF, Gyration and principle component analysis (PCA). We found that high pressure does not affect overall structure of DHFRs. However, large slow fluctuations that govern the functions of DHFR are significantly different between ecDHFR and mpDHFR, while the trajectory we used is rather short to sufficiently elucidate the result. The difference is likely to be caused from the E-helix fluctuation. The fluctuation differences should be responsible for the activity change of mpDHFR at high pressure.

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