

分子動力学シミュレーションによる Trp-cage 蛋白質の 高温及び高圧力環境下でのアンフォールディング過程研究

米 澤 康 滋¹

要 旨

蛋白質の立体構造は一次元に連なったアミノ酸残基がアミノ酸配列に特有な 3 次元構造に自発的にフォールディングして形成される。近年のゲノム配列決定の進展から数多くの蛋白質の遺伝子が解明されているが、アミノ酸配列のみから 3 次元立体構造を決定することは、一部の小さな蛋白質を除き、未だに大変困難である。本研究では構造変性過程（アンフォールディング）を詳細に研究する試みから構造形成過程（フォールディング）の手がかりを得ることを目指して、20 残基のアミノ酸で構成されるミニ蛋白質である Trp-cage 蛋白質の高熱及び高圧力による構造変性過程を、分子動力学シミュレーションで計算機上に再現して得られたデータを解析した。その結果、Trp-cage の変性は疎水性コアと 2 次構造が協調して大きく揺らぐことで進行してゆくことが示唆される結果を得た。この結果は今後一般の蛋白質のフォールディング過程の研究に役立つと思われる。

キーワード：分子動力学シミュレーション、蛋白質フォールディング、熱変性、圧力変性、安定性

1. 緒 論

蛋白質は生体内で多くの機能を果たしている重要な生体高分子の一つである。蛋白質は 20 種類の L 型アミノ酸が一次元に連なって生体内で連結され、そのアミノ酸配列によって熱力学的に安定な 3 次元構造を形成することが有名なアンフィンゼンの研究から明らかにされている（アンフィンゼンのドグマ）。その後、生体内で特有の形を取らない構造不定蛋白質（IDP）なども発見されているが、アミノ酸配列が蛋白質の立体構造を決定することは広く受け入れられている。近年、次世代シーケンサー等の急激な遺伝子解析技術発展によって生物の膨大なゲノム情報が簡単かつ迅速に明らかにされるようになってきた。これに伴い、様々な蛋白質を作るもととなる多くの遺伝子が明らかにされている。ところが、現代においてもこの遺伝子情報が記述するアミノ酸配列情報のみからその 3 次元構造を決定することは著しく困難である。

蛋白質は単純なアミノ酸配列から構成され、熱力学の法則に基づき最安定状態で 3 次元構造を形作る為、このアミノ酸配列情報のみから熱力学的に最安定構造を決定するには、周りの溶媒効果も考慮した数十万から数百万以上の自由度からなる超多自由度の力学系の位相空間を網羅することが必須であり、この様な系の定量的な評価は現代最先端の技術と理論を持っても大変困難である。

近年、分子シミュレーション^[1]は実験を補佐する重要なツールとして生命科学分野でも活用されている。分子シミュレーションは実験では不可能な空間時間分解能での観測が可能である一方で、最先端の理論及び技術を駆使しても到達可能な時間領域が生命分子の時間領域に遥かに及ばない問題がある。本研究では、蛋白質のフォールディング過程の解明の糸口を模索する一環として、実験的にも理論的にもその解明が進んでいる Trp-cage 蛋白質⁽¹⁾を研究対象とした分子シミュレーション計算を実施した。Trp-cage は 20 アミノ酸残基からなる小さな人工蛋白質であり、室温で定まった構造を形成することが実験的に確認

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

されているが、このような小さな蛋白質においてもフォールディングは通常の分子動力学シミュレーションで到達することは容易ではなく特別な専用計算機が必要である。

我々はこの問題を避けるために、温度を高めることで Trp-cage 構造に短時間に誘起される unfolding を長時間分子動力学シミュレーションで研究した。温度による変性は、室温でのフォールディング過程の逆過程と考えることができる。従って Trp-cage 蛋白質の変性過程を詳細に研究することで一般的な蛋白質のフォールディング過程を考察する手がかりを得ることが出来る可能性が大いにある。

これに加えて、我々は高圧力による Trp-cage 蛋白質の変性効果を含むシミュレーションも実施した。圧力は熱力学の重要な軸の一つであり、圧力を変化することでこれまでに得られなかった蛋白質の熱力学的性質を明らかにできる可能性がある。本研究では構造が高温または高圧力でどのような変性効果を見せるかに焦点を絞って解析を実施した。蛋白質のフォールディング過程はアンフォールド状態からモルテングロビュール状態と呼ばれる中間状態的を経て天然構造を形成するモデルが提唱されている。モルテングロビュール状態は緩んだ 2 次構造が形成されつつ同時に疎水性のコアが協調して形成されつつある様な、天然状態を構成するために経由すべき状態であると推測されている。このような状態を同定するために 2 次構造の時間変化を高温及び高圧力に設定したシミュレーション結果から追跡した。またこれに加えて親水性残基と疎水性残基の溶媒露出表面積の変化を評価し、これらの結果を総合的に解析した。その結果、これらの変性過程から 2 次構造と疎水性コアの構造変化が協調して進行する事を示唆する結果を得た。

2. モデル系の構築と計算方法

Trp-Cage の構造として NMR 分光実験で 3 次元構造が解かれている PDB-ID: 1L2Y を用いた。この構造から NMR で決定された水素原子を取り去り標準 pH 条件のもと水素原子を付加した。

図 1 に、1L2Y の立体構造を示す。Trp-cage のアミノ酸配列は、

NLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS

の 20 アミノ酸残基である。この図から Trp-Cage は主要な 2 次構造として一つの α ヘリックスを持ち、図 1 のようにさらに 6 番目の Trp アミノ酸残基を全体で取り囲む様な構造を成していることが分かる。

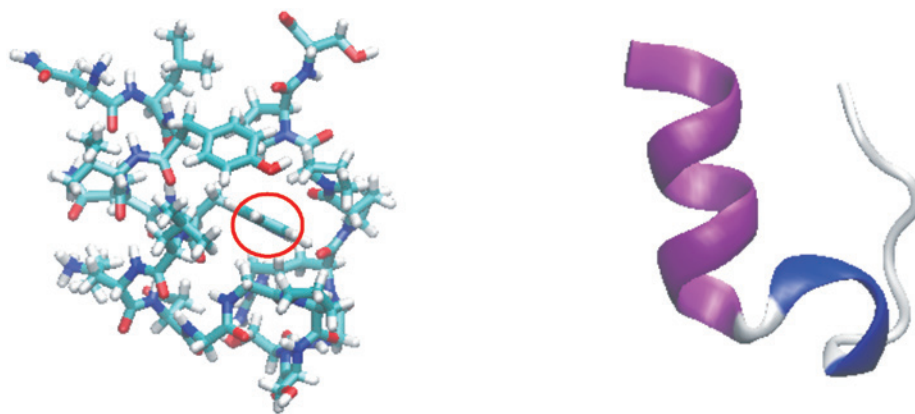


図 1 Trp-Cage の構造 (1L2Y)、左：スティックモデル表示、右：カトーン表示、Trp 残基を赤丸で示す。

この水素原子が付加された構造を、TIP3P 水モデル^[3]で作成し温度 300 K、1 気圧で十分平衡化した溶媒の箱の中心に置き、蛋白質分子の原子と 3 Å 以内にある水分子を排除した。箱の端と蛋白質原子の最短距離が 12 Å 以上になるようにこの箱の大きさを調整した。さらに溶媒のイオン強度を 150 mM にするために、適切な数の Na イオンと Cl イオンを水分子と置換した。この際、系の電荷がゼロになるように調整した。この系を周期的境界条件下で取り扱った。蛋白質の力場は Amber ベースの力場^[4]を用いた。

構築した系から接近しすぎた原子間コンタクトや余分な空間等を無くするためにエネルギー最小化を 1000 ステップ実施した。水分子は SELLTE アルゴリズム^[5]で剛体として取り扱った。また蛋白質の化学結合は LINCS アルゴリズム^[6]で剛体として取り扱った。静電相互作用は Particle Mesh Ewald 法 (PME)^[7]を用いて計算した。実空間の cut-off は 8 Å とし、逆空間の grid スペーシングは 1.2 Å とした。vdW 相互作用は 8 Å の cut-off 法で取り扱った。エネルギー最小化後に、粒子数一定・温度及び体積一定の分子動力学シミュレーションを 5000 ステップ実施し、その後粒子数一定、温度及び圧力一定 (NPT) の分子動力学シミュレーション 50000 ステップを実行して十分に平衡化した。

分子動力学シミュレーションの時間刻み幅は 2 フェムト秒とし時間積分アルゴリズムは leap-frog 法を用いている。温度の制御には Nose-Hoover 法^[8]を、圧力の制御には Andersen 法^[9]を用いた。NPT 分子動力学シミュレーションの後に、データを収集する本番シミュレーションを 500 ナノ秒実施した。基準として 310 K のシミュレーションを実施した (以後 310 K (1 気圧) と略記)。データは系の全位置座標を 2 ピコ秒ごとに収集している。これに加えて、高温シミュレーションを 350 K、1 気圧で、高圧力シミュレーションを 310 K、2000 気圧でそれぞれ上と同様に準備し平衡化した (以後それぞれ、350 K (1 気圧)、310 K (2000 気圧) と略記)。以上 3 つの異なる条件のシミュレーションを 0.5 マイクロ秒の長さまで計算した。分子動力学シミュレーションプログラムとして gromacs4.5.5^[10]を用い、データの解析には gromacs に付随している analysis プログラムを活用した。2 次構造の同定には DSSP プログラム^[11]を用いた。

図 2 に本研究で使用した系を示す。表示に用いたプログラムは VMD^[12]である。

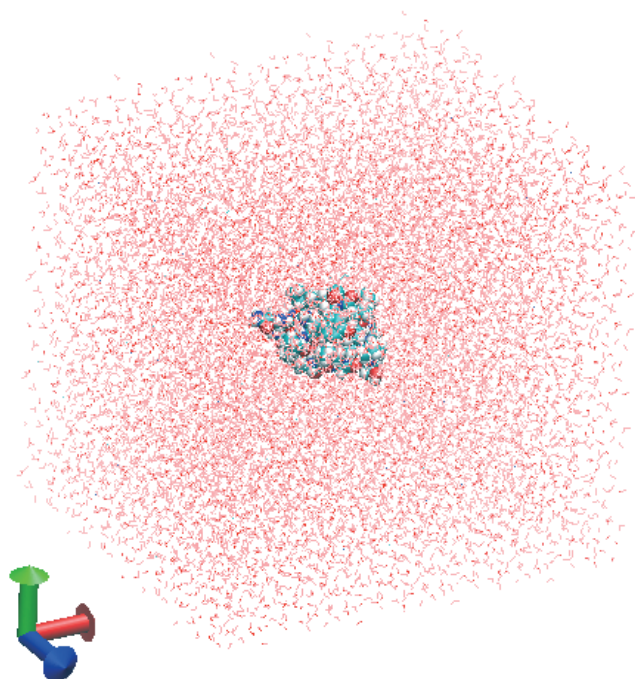


図 2 計算に用いた Trp-cage 系、蛋白質部分は vdW 表示で、溶媒部分は線表示 (ピンク) を用いた。

3. 結果と考察

3.1 RMSD

1 気圧 310 K、350 K 及び 2000 気圧 310 K のシミュレーションの Root-Mean-Square-Deviation (RMSD) の時間変化を図 3 に示す。RMSD は以下の方程式に従って計算した。N は Ca 原子の全個数、 $r_i(t)$ は時刻 t における Ca 原子の位置座標を示す。

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

図 3 から、310K (1 気圧) の構造で 100ns 時に RMSD が 0.1 nm から 0.2 nm へ大きく増大しており、350 K (1 気圧) でも 120 ナノ秒時に構造が変化していることが分かる。さらに 310 K (2000 気圧) では 270 ナノ秒後に同様に RMSD の増大が見られる。時刻 $t=0$ の構造は NMR 実験構造を用いているが、実験状態とシミュレーションでは温度または溶媒条件が異なることから実験構造が必ずしもシミュレーション条件での安定構造ではないことを示唆していると考えられる。温度を上げた効果として 310 K の場合よりも 350 K では構造の揺らぎが大きい事がわかる。また高圧力をかけることで構造変化が遅れて生じていると思われるが、RMSD の揺らぎが 1 気圧の場合と比べて小さくなっていない事は圧力の効果を示唆するものとして大変興味深い。

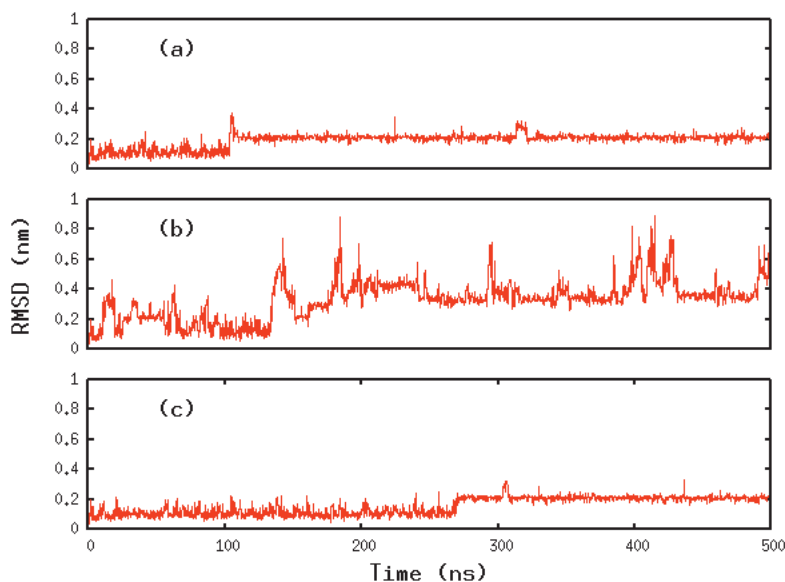


図 3 構造の RMSD 時間変化、
(a) 310 K (1 気圧)
(b) 350 K (1 気圧)
(c) 310 K (2000 気圧)
の結果をそれぞれ示す。

3.2 慣性半径変化

シミュレーションで得られた慣性半径 (Radius of Gyration : Rg) を図 4 に示す。横軸は時間 (単位は ナノ秒)、縦軸は RMSD を示す (単位は nm)。この図から 310 K (1 気圧) の Rg は RMSD と同様に 120 ナノ秒付近で僅かに増大していること、及び 310 K (2000 気圧) も RMSD の場合と同様に 270 ナノ秒後にやや増大していることが分かる。一方、350 K (1 気圧) の Rg は大きく揺らいでおり、150 ナノ秒、180 ナノ秒、400 ナノ秒付近で特に大きな揺らぎが観測されている。

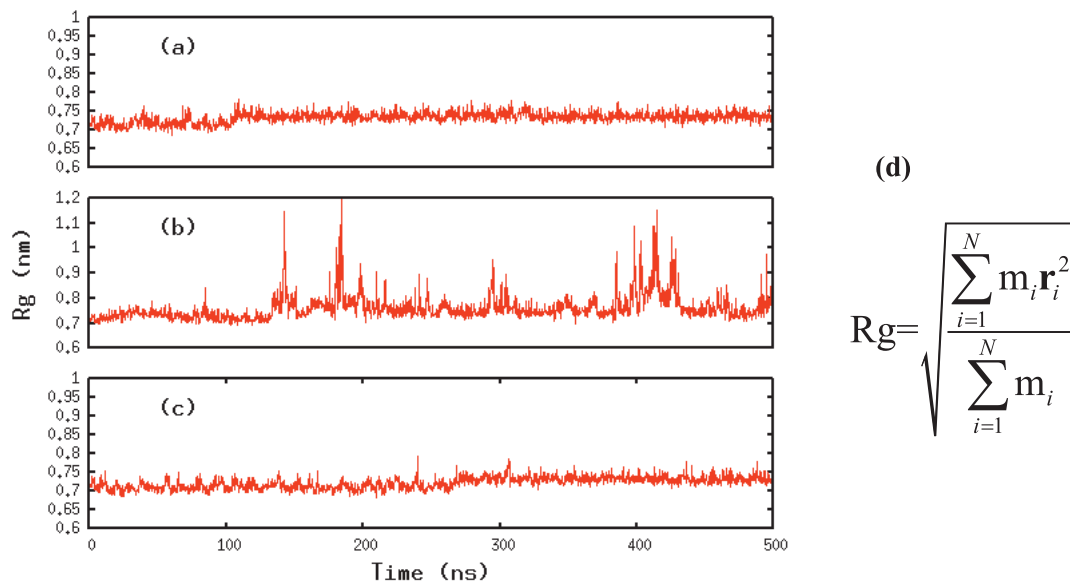


図4 Trp-cage の慣性半径 (Rg) の時間変化、横軸は時間 (単位ナノ秒) 縦軸は Rg 値 (単位は nm)、
(a) 310 K (1 気圧)、(b) 350 K (1 気圧)、(c) 310 K (2000 気圧)、(d) 慣性半径の計算式；
N は Ca 原子の数、m は Ca 原子の質量、r は Ca 原子の位置ベクトルをそれぞれ示している。

3.2 2次構造変化

蛋白質の2次構造は3次元立体構造の基となる局所構造であり、その構造変化は Trp-cage のアンフォールディング過程を考察する上で大変重要な情報である。図2に DSSP で決定した Trp-Cage 構造の2次構造変化の時間依存性を示す。

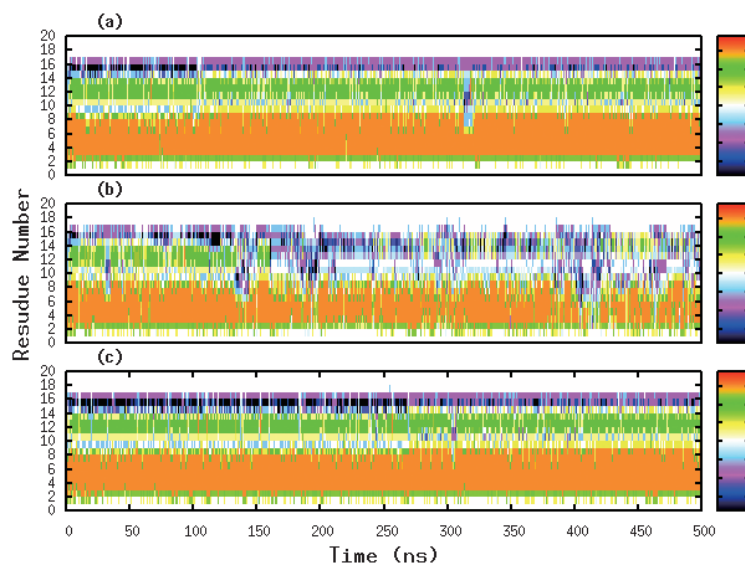


図5 Trp-Cage の2次構造変化、(a) 310 K (1 気圧) (b) 350 K (1 気圧) (c) 310 K, (2000 気圧)、
横軸は時間 (単位ナノ秒)、縦軸はアミノ酸番号を示している。オレンジ色は α ヘリックス構造、
緑色は 3_{10} ヘリックス構造、黄色は 5-ヘリックス構造、空色は水素結合したターン構造、マゼン
タ色は β ブリッジ構造、青色は伸長構造を、色が無い部分は2次構造がアサインされない領域、
をそれぞれ示している。

310 K (1 気圧) のシミュレーションでは 2 番目の Leu から 8 番目の Asp にかけて形成される α ヘリックス及び、15 番目の Gly 残基を中心とする β ブリッジ構造も安定に存在している事が示されている。さらにこれらの図からは、310 K (2000 気圧) は RMSD に有意な変化が生じたにも関わらず、特徴的な α ヘリックスが良く保持されており 2 次構造の変化は殆ど生じていないことが分かる。一方で、350 K (1 気圧) の Trp-cage2 次構造は Leu2 から Asp8 にかけて形成される α ヘリックスがその構造が徐々に崩れる様子が観測できる。

3.3 溶媒露出表面積

2 次構造以外に蛋白質のフォールディング及びアンフォールディングに重要な寄与を及ぼすものとしてアミノ酸残基の溶媒露出表面積 (Accessible Surface Area; ASA) がある。一般に蛋白質は水溶媒中に存在して機能を発揮する。アミノ酸は疎水性残基と親水性残基に大別されるがフォールドした蛋白質は疎水性残基の溶媒露出による自由エネルギーロスを避けるために、親水性残基は溶媒に露出しかつ疎水性残基は溶媒露出面積をできるだけ最小になるような配置を取ることが知られている。

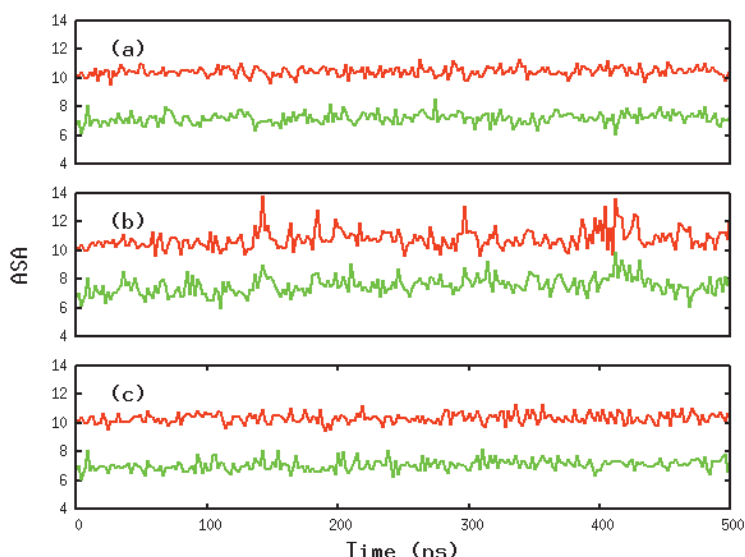


図6 (a) 310 K (1 気圧)、(b) 350 K (1 気圧)、(c) 310 K (2000 気圧) のシミュレーションから算出された溶媒露出部分表面積、親水性残基 (赤線)、疎水性残基 (緑線) で示している。横軸は時間 (単位はナノ秒)、縦軸は溶媒露出表面積 (ASA: 単位は nm^2) を示している。

310 K (1 気圧) の親水性残基及び疎水性残基の溶媒露出部分表面積は一定であり、この時間領域で Trp-cage の 3 次構造は安定していることは明らかである。また 310 K (2000 気圧) のシミュレーションでも溶媒露出部分表面積は同様に一定である。一方、350 K (1 気圧) のシミュレーションは親水性残基及び疎水性残基共に溶媒露出部分表面積に大きな揺らぎが生じることを示している。興味深いことに親水性残基の示す揺らぎと疎水性残基の示す揺らぎには高い正の相関が認められる。この事は疎水性コアの安定性と親水性残基の溶媒露出性の関連を示すものとして重要であろう。

以上の結果を総合すると、(1) NMR 構造は必ずしも安定構造ではないことを示唆するとともに、(2) 高温条件は Trp-cage の構造に大きな揺らぎを生じさせることが明らかとなった。さらに、(3) 高圧力のシ

ミュレーションからは高温の場合とは逆に、圧力負荷が構造を安定化する効果が有ることが明らかとなった。

4. 結 論

実験及び理論計算でよく研究されている Trp-cage ミニ蛋白質を用いて、高温と高圧力によるアンフォールディング過程を長時間分子動力学シミュレーションで研究した。分子動力学シミュレーションの安定構造は、NMR 実験で決定された構造とは異なる RMSD を示した。高温のシミュレーションからは、高い温度（350 K）は Trp-cage の構造に大きな揺らぎを生じさせることが、RMSD、2 次構造変化、溶媒露出表面積の解析から明確に示された。一方、高圧のシミュレーションからは、高い圧力は Trp-cage 蛋白の構造の揺らぎを抑圧する効果があることを示す結果を得た。これらの知見は今後 Trp-cage 蛋白質を用いたフォールディング研究を推進する上で大いに役立つと思われる。

謝 辞

近畿大学先端技術総合研究所及び生物理工学部に関わる方々全てに深く感謝申し上げます。この研究は生物理工学部長松本和也先生、研究所所長細井美彦先生、高圧力蛋白質研究センター長梶山慎一郎先生、橘秀樹先生を初めとする先端技術総合研究所と生物理工学部に係る教職員皆様のご支援によるものです。

参考文献

- 1 . McCammon, J.A., Gelin B.R., Karplus M., Wolynes P.G., 1976, The Hinge-Bending Mode in Lysozyme. *Nature* 262, 325-326.
- 2 . Neidigh, J.W. Fesinmeyer, R.M. Andersen, N.H., 2002, Designing a 20-residue protein, *Nat.Struct.Biol.*; 9:425-430
- 3 . Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. 1983, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926.
- 4 . 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., 2003, A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations, *J Comput. Chem.* Dec, 24 (16): 1999-2012.
- 5 . Miyamoto, S., Kollman PA. 1992, SETTLE: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models. *Journal of Computational Chemistry* 13 (8): 952-962.
- 6 . Hess, B., Bekker H., Berendsen HJC, Fraaije JGEM. 1997, LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations *Journal of Computational Chemistry* 18 (12): 1463-1472
- 7 . Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L. G. 1995, A smooth particle mesh ewald method. *J. Chem. Phys.* 103, 8577-8593.
- 8 . Nose, S. 1984, A unified formulation of the constant temperature molecular-dynamics methods. *Journal of chemical physics* 81 (1): 511-519.
- 9 . Andersen, Hans C. 1980, Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature *Journal of Chemical Physics*, Volume 72, Issue 4, pp. 2384-2393.

10. Sander Pronk, Szilárd Páll, Roland Schulz, Per Larsson, Pär Bjelkmar, Rossen Apostolov, Michael R. Shirts, Jeremy C. Smith, Peter M. Kasson, David van der Spoel, Berk Hess, Erik Lindahl. 2013, GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit". *Bioinformatics* 29 (7): 845–854.
11. Robbie P. Joosten, Tim A.H. te Beek, Elmar Krieger, Maarten L. Hekkelman, Rob W.W. Hooft, Reinhard Schneider, Chris Sander, and Gert Vriend. 2011, A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Research* January; 39 (Database issue): D411–D419.
12. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., 1996, VMD - Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, vol. 14, pp. 33–38.

英文抄録

Molecular Dynamics Simulation Study on the Unfolding Processes
in Trp-cage protein under high-Pressure and high-TemperatureYasushige Yonezawa¹

Proteins spontaneously fold in living system, obeying thermodynamics principle. However, at present, it is not possible to provide the three-dimensional structure from the corresponding amino-acid sequence by only using theory and computation. Proteins are very complex matter in the world, involving huge degree of freedom. We have tackled the folding problem with respect to well-studied 20 residues mini-protein Trp-cage. We conducted three different long 0.5 μ s molecular dynamics simulations, 1) 310 K and 1 atm, 2) 350 K and 1 atm, 3) 310 K and 2000 atm together with explicit water environment. As a result, it was observed that high-temperature increases the fluctuation of the system, in particular, the secondary structure, the accessible surface area and the radius of gyration of Trp-cage protein. In contrast, high-pressure decreases the fluctuation significantly. These observation suggests that the secondary structure and hydrophobic core are fluctuating cooperatively. The results are useful for further study toward the general folding process of proteins.

Key words: protein stability, folding, unfolding, molecular dynamics simulation

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