

分子動力学シミュレーションによるタンパク質ドメイン運動の解析

近藤 寛子, 沖本 憲明, 森本 元太郎, 泰地 真弘人

東大 新領域, 理研 ASI

h_kondo@gsc.riken.jp

概要: 近年、X線結晶構造解析やNMRによる解析から、多くのタンパク質においてリガンド結合状態と非結合状態の間の構造の違いが明らかになってきた。このような構造変化は、これまで2つの典型的なモデルによって説明されてきたが、その生体内での振る舞いは未だ明らかにされていない。そこで我々は、総計1マイクロ秒以上の分子動力学シミュレーションを行い、リガンド結合に伴うタンパク質の自由エネルギー地形の変化を解析することを試みた。計算対象には、実験的に構造変化のメカニズムが異なると理解されている2種類のタンパク質を選択した。その結果、これらタンパク質のリガンド結合に伴う構造変化は、アポ状態の構造の揺らぎとリガンド結合に伴う相互作用が共同的に働くことで引き起こされることが示唆された。

1 背景と目的

タンパク質の構造はリガンド分子の結合により多様に変化することが知られており、この構造変化はタンパク質の機能と密接に関係している。そのため、このメカニズムを理解することは生命科学において非常に重要であるといえるだろう。

現在、このようなリガンド結合に伴う構造変化に対して2つの典型的なモデルが提唱されている。1つは *pre-existing equilibrium dynamics* (以下、*pre-existing model*) であり、もう1つは *induced-fit model* である (図1)。前者においては、タンパク質の構造変化は主にゆらぎによって起こり、リガンドの結合は構造の安定化のみに寄与する。一方、後者のモデルでは、リガンドの結合が構造変化を積極的に引き起こすとする。

しかしながら、実験から構造の遷移経路を知ることが困難であるため、実際の生体内での構造変化については明らかになっていない。そこで本研究では、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いてその構造変化のメカニズムを解析することを目的とする。

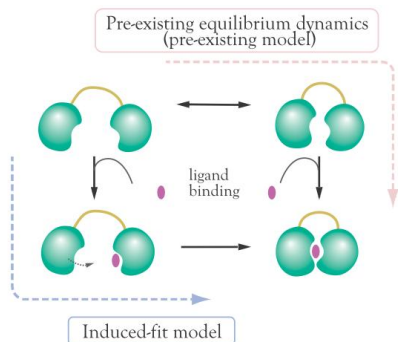


図1 構造変化のモデル

2 方法

本研究では、以下の2種類のタンパク質を対象として解析を行った。

- Lysine/arginine/ornithine-binding protein (LAO)
- Maltose-binding protein (MBP)

両タンパク質はバクテリアのペリプラズムにおいて物質の輸送に関わっており、2つのドメインとそれらをつなぐヒンジ部分から構成される。LAOは、アポ体とホロ体の結晶構造解析からその構造変化のメカニズムは *pre-existing model* であると考えられているのに対し¹、MBPはNMRによる解析などから *induced-fit model* であると考えられている²。

LAO, MBPともにアポ体およびホロ体の結晶構造が得られていることから、以下の流れで解析を行った。

- ① 構造変化のダイナミクスを調べるために、結晶構造を含む4種類の初期構造からMDシミュレーションを行い、得られたトラジェクトリに対して主成分分析 (PCA) を行った。
- ② アンブレラサンプリングにより自由エネルギー地形を計算。アンブレラサンプリングで用いる構造空間の座標軸として、LAOでは上位2主成分軸 (PCA1, PCA2) を使い、MBPでは計算量の問題などから第一主成分軸のみを用いた。また、各点のアンブレラポテンシャル V_i は、 j 番目の主成分軸 (固有ベクトル) \mathbf{X}_j における各構造 \mathbf{r} の主成分の値に対して式 (*) を用いて計算した。

$$V_i = \frac{1}{2} k \sum_j (\mathbf{r} \cdot \mathbf{X}_j - \phi_{i,j})^2 \dots (*)$$

各点 1 ns 程度のシミュレーションを、アポ体、ホロ体合わせて LAO では約 1000 本、MBP では 70 本程度行った。

全ての MD シミュレーションにはソフトウェア AMBER 8.0 を使用した。

3 結果

MD シミュレーションでは、両タンパク質ともに、アポ体の結晶構造から始めたものは open state 付近、ホロ体のものは closed state 付近ではほぼ安定に存在していた。また、アポ体の結晶構造にリガンドを付加したものでは open state から closed state への遷移がみられた。これらのトラジェクトリに対する PCA の結果、上位 2 主成分軸は LAO, MBP ともにドメインの開閉運動およびツイスト運動をそれぞれ表していた。

ここで得られた軸をもとにアンブレラサンプリングを行った結果は以下の通りである。

【 LAO 】 アポ体、ホロ体ともに、アンブレラサンプリングの結果得られた自由エネルギー地形において結晶構造付近が最安定構造となっていた。また、アポ体の安定構造としては open state の他に新規の構造である semi-closed state が存在していた。これらのことから、LAO では open state と semi-closed state の間の広い領域でリガンドが結合する可能性が示唆された。

LAO は実験的には pre-existing model であると考えられていたが、pre-existing model と induced-fit model の複合的な経路 (図 2; ②, ③) に加え、完全な induced-fit の経路 (図 2; ①) も存在することが示唆された。

【 MBP 】 アンブレラサンプリングの結果は、LAO と同様、アポ体、ホロ体ともに自由エネルギー地形において結晶構造付近が最安定状態となっていた。またアポ体では、結晶構造よりもやや閉じた部分 (semi-open state) およびホロ体の結晶構造付近 (semi-closed state) にも安定状態が存在していた。

semi-closed state のエネルギーはやや高く、安定な状態がほぼ open state 付近に限られていること、及び MD の結果を考慮して、MBP ではリガンドの結合が構造変化に大きく寄与していることが示唆された。

また、本研究からはアンブレラサンプリングの結果が初期構造に大きく依存するという問題点も明らかになった。

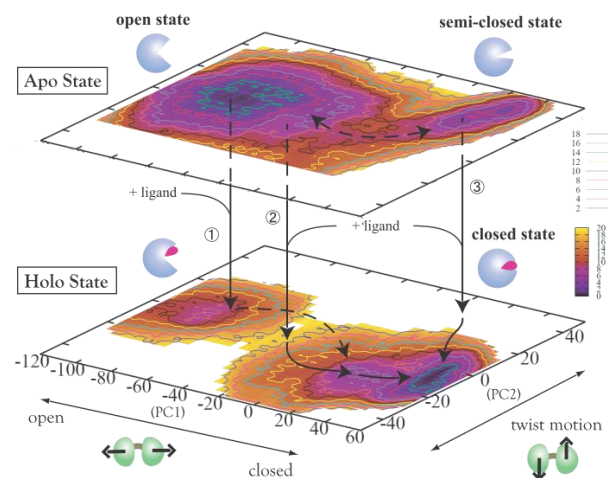


図 2 LAO の自由エネルギー地形および構造変化の模式図

4 まとめ

本研究では、タンパク質のドメイン運動の解析として LAO 及び MBP の構造とエネルギーに関する解析を行った。

アンブレラサンプリングから得られた結果は定性的には実験結果に一致しており、今回対象とした 2 種類のタンパク質では、アポ状態の構造の揺らぎとリガンド結合に伴う相互作用が共同的に働くことによって構造変化が引き起こされることが示唆された。

しかしながら、本研究では大規模な系にアンブレラサンプリングを適用する際の問題点も残されている。今回用いた手法は計算量が大きく、また構造サンプリングとしてはまだ不十分である。今後はこれらの問題点を考慮し、新たな手法についても検討したい。

参考文献

- [1] Oh, B. H. et al., "Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand", *J. Biol. Chem.*, **268**, 15, 11348-11355, 1993
- [2] Millet, O. et al., "The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy", *PNAS*, **100**, 22, 12700-12705, 2003