

MDシミュレーションによるBPTI[5-55]の1残基Ala置換体の熱安定性の計算

黒田研究室

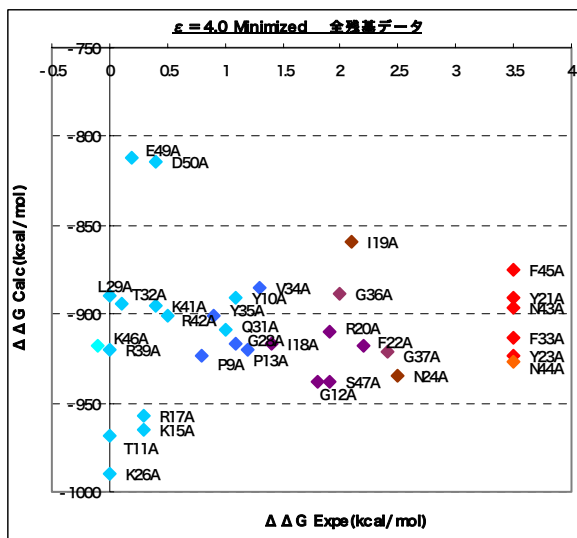
学籍番号 02251028

小山哲平

【研究背景】 タンパク質の機能発現を支えるのはそのタンパク質が持つ固有の立体構造に拠るところであり、立体構造形成に必要なのはアミノ酸配列に刻まれた情報である。しかしながら、幾つかの特定の残基が立体構造安定化に必要な不可欠とされる一方で、置換されても本来の立体構造に与える影響が殆どない残基も存在する。1995年には、Peter.Kim らによってBPTI(牛膝臓トリプシン阻害剤)への1残基アラニンスキャニング法を用いた実験が行われ、各残基毎の立体構造に対する貢献度が、ギブス自由エネルギーの変化量という形で、実験的に計測された。この実験を踏まえて、本研究ではBPTI[5-55]の1残基Ala置換体を対象として分子動力学計算(MDシミュレーション)を行い、その結果を用いてギブス自由エネルギーの算出を行うことにする。そして、それら計算結果と上で述べた実験結果との相関を得るのに最適な条件を明らかにすることを目的とする。

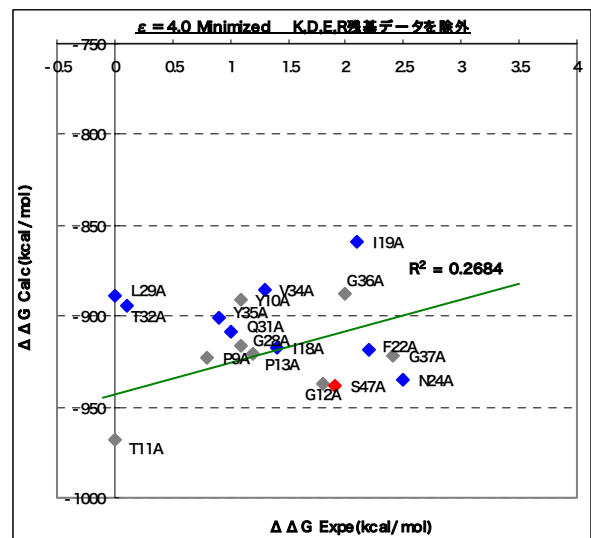
【実験方法】 本研究では、BPTI構造体の熱力学的安定性を測定するために1つの1残基Ala置換に対して4種の構造体を設計してMDシミュレーションを行う。即ち、①Native-Wild体、②Denatured-Wild体、③Native-Mutant体、④Denatured-Mutant体である。Wild(野生型)とMutant(変異型)とは、置換対象残基をAla置換しているかどうかで区別の基準となり、Native(天然状態)とDenatured(変性状態)とは、BPTIの立体構造が折られたみによって保たれているか、解かれてしまった状態であるかが区別の基準となる。立体構造が未だ明確に決定されていないDenaturedに関しては、置換対象残基を中心として前後5残基の配列を保存したまま直鎖状に伸びきった計11残基の構造を設計する。シミュレーションは、専用のハードウェアであるMDGRAPE-2を搭載したMD MachineとソフトウェアパッケージであるAMBER6.0及び7.0を用いて行う。シミュレーション時間は1nsec、タイムステップは1fsecで、10psec毎に構造座標データのサンプリングを行い、710~1000psecでの結果をエネルギー計算に用いる。ギブス自由エネルギー $G$ の計算は、MM-PBSA2法とN-mode法によって、エンタルピー $H$ を分割した5つのエネルギー項( $E_{inter}$ :分子内部エネルギー、 $E_{vdw}$ :ファンデルワールス力、 $E_{ele}$ :静電的相互作用、 $G_{PB}$ :Poisson-Boltzmann式で与えられる溶媒との静電的相互作用、 $G_{SA}$ :溶媒との非極性相互作用)とエントロピー $S$ を算出してから行い、①~④で求められた $G$ から自由エネルギーの変化量 $\Delta\Delta G = \{G(②) - G(①)\} - \{G(④) - G(③)\}$ を算出する。

【結果考察】 シミュレーション結果に対して、データのバラつきを抑えるために構造最適化を行い、タンパク質内部の誘電率 $\epsilon = 1.0$ とした場合と、 $\epsilon = 4.0$ とした場合の2通りで $\Delta\Delta G$ を算出した。全ての場合において、 $\Delta\Delta G_{Expe} = 3.5$  kcal/molとなるデータは相関を満たすプロットが得られなかった。これは実験では即座に変性が起こってしまう変異体に対して、強制的にBPTI構造をとらせてシミュレーションさせたためであり、Native-Mutantの設計に問題があると考えられる。また、 $\epsilon$ を1.0から4.0に変化させると、 $G_{PB}$ の値の変化幅が小さくなり、 $G$ 値の時間遷移が $G_{PB}$ と $E_{ele}$ の遷移に依存していたのが $E_{ele}$ のみに依存するようになった。さらに、そのままでは相関係数が小さい値になってしまうので、各残基を溶媒露出表面積や極性、二次構造などのパラメータによって分類し、実験結果とより高い相関を示す残基の条件付けを行った。結果として、計算値である $\Delta\Delta G_{Calc}$ と実験値である $\Delta\Delta G_{Expe}$ の絶対値のスケールは大きくずれてしまったが、 $\epsilon = 4.0$ の場合に、親水性でない残基であり、尚且つ二次構造をとらない残基の1残基Ala置換体でよい相関が得られた。



(fig.1):  $\epsilon = 4.0$ での計算結果( $\Delta T_m$ による色別、

$\Delta T_m = \sim 5.0, \sim 10.0, \sim 15.0, \sim 20.0, 20.0 \sim$ )



(fig.2):最適条件における $\Delta\Delta G$ の相関関係

(二次構造= $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, ランダム鎖)